



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Implementación de un método colorimétrico para la cuantificación de óxido de cromo en estimación de consumo de bovinos bajo pastoreo**

**Alexandra Torres Ospina**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Departamento de Producción Animal  
Medellín, Colombia  
2018



# **Implementación de un método colorimétrico para la cuantificación de óxido de cromo en estimación de consumo de bovinos bajo pastoreo**

**Alexandra Torres Ospina**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Agrarias**

Director (a):

Jesús Humberto Gil Rodríguez (Ph. D, Químico)

Codirector (a):

Julian Zapata Ochoa (Ph. D, Químico)

Línea de Investigación:

Producción Animal y Gestión Ambiental

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Biotecnología Ruminal y Silvopastoreo *BIORUM*

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Producción Animal

Medellín, Colombia

2018



*A mi madre, que lo soñó y lo consiguió*

*Lo que distingue las mentes verdaderamente originales no es que sean las primeras en ver algo nuevo, sino que son capaces de ver como nuevo lo que es viejo, conocido, visto y menospreciado por todos.*

*Friedrich Nietzsche*



## Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas, organizaciones e instituciones que permitieron alcanzar todas las metas de mi investigación:

A Edwin Franco, mi motor y soporte, pues sin él, este camino no habría sido posible.

A mi familia, por su amor, paciencia y apoyo incondicional durante la culminación de mis estudios, especialmente a mi madre, que fue mi principal motivación, a mis hermanos por alentarme siempre a exigirme más.

Al profesor Julián Zapata Ochoa de la Universidad de Antioquia, Químico, PhD. Universidad de Zaragoza, España, quien fue mi principal guía, por su ayuda incondicional, orientación, paciencia y disposición en cada una de las etapas de esta investigación.

A los profesores Jesús Humberto Gil y Luis Alfonso Giraldo de la Universidad Nacional de Colombia, por la oportunidad que me dieron de realizar esta investigación y proveer los recursos y herramientas necesarias para la ejecución de este trabajo.

A los profesores Omar Camargo, Héctor Jairo Correa, Carmen Elena Zapata, Sebastián Reynaldi, Orlando Simón Ruiz de la Universidad Nacional y especialmente al profesor Carlos López Córdoba de la Universidad de Antioquia por la ayuda prestada a lo largo de este camino y siempre que lo requerí.

A Alejandra Marín Gómez, Cristina Ramírez, Laura Cristina Henao Valladares, Julián Arroyave Jaramillo y Andrea Montilla, que formaron parte de mi equipo de trabajo en

laboratorio y campo y que sin su valiosa colaboración no se habría podido llevar a cabo esta investigación.

Al personal de la estación agraria Paysandú. Universidad Nacional de Colombia por facilitar los animales y las instalaciones del centro agropecuario durante la ejecución del trabajo de campo.

Al Grupo de Investigación en Biotecnología Ruminal y Silvopastoreo –BIORUM-. Universidad Nacional de Colombia por facilitar las instalaciones, equipos y materiales del Laboratorio de Biotecnología Ruminal y facilitar el desarrollo del presente trabajo.



## Resumen

El objetivo principal de este trabajo fue la implementación de un método colorimétrico para la cuantificación de cromo en heces y alimentos bovinos con el fin de determinar consumo de forrajes en animales bajo sistemas de pastoreo tradicionales mediante la técnica del marcador externo de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Para ello, se evaluó el método colorimétrico de Fenton en muestras y estándares de referencia, encontrando que, bajo las condiciones de análisis, no se lograba la recuperación completa del Cr, por lo que se realizaron diferentes ensayos de optimización de condiciones con el fin de definir los factores críticos del método y encontrar las condiciones óptimas para potenciar su *performance*. Se encontró que la incineración adecuada de las muestras es a 700 °C durante 12 h y que la temperatura y tiempo de digestión adecuados son 250 °C y 30 minutos. Se evaluó el efecto matriz, encontrando que, aunque no hay efecto significativo ( $p>0.05$ ), la mezcla digestora presenta señal a lo largo del espectro y debe usarse como blanco para la corrección de las lecturas espectrofotométricas. Para la selección de la longitud de onda ( $\lambda$ ), se realizó un análisis espectral sobre un set de 50 muestras correspondientes a estándares y heces con contenido conocido de Cr y se aplicó un método de proyección de variables principales (VIP) haciendo uso de los parámetros obtenidos por análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados parciales (PLS), con lo que se halló la  $\lambda$  óptima para el análisis en 362 nm. Con los resultados obtenidos, se propone un protocolo de análisis que optimiza la sensibilidad para la cuantificación del analito en muestras de heces bovinas y alimentos con contenido de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .

La validación del método analítico se realizó a través de la evaluación de los parámetros de selectividad, precisión, linealidad, exactitud, estabilidad y límites de detección y cuantificación. Se encontró que el método es selectivo para muestras de heces y alimentos con contenido de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y que no se presentan interferencias debido a la matriz, a la mezcla de digestión o a la presencia de  $\text{TiO}_2$ , el cual no interfiere significativamente ( $p>0.05$ ) con la recuperación del Cr. Se evaluó la linealidad por

regresión lineal ponderada entre 3 y 25 mg Cr/kg hallando un  $R^2$  de 0.996 y error típico de 0.02 para el modelo. Se calcularon el  $LOD$  y el  $LOQ$  a partir de los valores de absorción obtenidos para blancos de la mezcla digestora, encontrando un  $LOD$  de 2.9 mg Cr/kg y un  $LOQ$  de 3.6 mg Cr/kg. La precisión intermedia se evaluó en cinco días no consecutivos y dos analistas en tres niveles de concentración y se halló un RSD global de 3.6%, por lo que el método se considera preciso. La exactitud se evaluó como porcentaje de recuperación de Cr en un material de referencia fabricado a partir de muestras de heces provenientes de animales no dosificados con  $Cr_2O_3$  y enriquecidas con 15 mg Cr/kgMS, encontrando una recuperación de  $98.99\% \pm 2.11\%$ , por lo que se consideró el método exacto. Se evaluó la estabilidad del color tomando lecturas de absorción de muestras de  $H_0$  enriquecidas con 15 y 25 mg Cr/kg y almacenadas durante 180 días. Se encuentra que no hay diferencia significativa entre las mediciones realizadas el día 1 y los días 30, 60 y 180; pero dado que existe tendencia de aumento de la señal en el tiempo, se establece un almacenamiento máximo de 60 días para las muestras procesadas. Se concluye que el método es satisfactorio para la cuantificación de Cr en heces provenientes de animales dosificados con  $Cr_2O_3$  y que su alcance se extiende a alimentos que le contienen, así como a muestras de animales a los que se les haya suministrado simultáneamente  $TiO_2$ .

Finalmente se implementa el método desarrollado y validado para la estimación de la producción de heces en un experimento de consumo con vacas Holstein pastando kikuyo y suplementadas con dos tipos de concentrado comercial. Los resultados obtenidos mediante el método implementado fueron contrastados con un método de referencia, encontrando una diferencia crítica de 0.03 mg Cr/kg ( $p>0.05$ ), por lo que se determinó que no hay diferencia en la estimación de producción de heces y que el método colorimétrico es apropiado para ensayos de campo. Se estimó el consumo haciendo uso de los marcadores internos FDNi, FDAi y MSi y del externo analizado por ambas metodologías, encontrando que los valores de PH no difieren ( $p>0.05$ ) y que la variación de los reportes de consumo no está ligada al método de cuantificación de Cr, por ende, el método colorimétrico puede ser aplicado indistintamente de los marcadores internos para ensayos de digestibilidad de rumiantes.

**Palabras clave:** (Validación, colorimetría, consumo, marcador externo, dióxido de cromo, producción de heces).

## Abstract

The aim of this work was the implementation of a colorimetric method for chromium quantification in faeces and bovine foods from digestibility studies for estimation of forage individual intake in animals grazing on traditional systems through an external marker of  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . For this, the Fenton's colorimetric method was evaluated in samples and reference standards finding that, under the conditions of analysis, the recovery of Cr was not achieved, so different optimization tests were carried out to define the critical factors of the method and find the optimal conditions to enhance its performance. It was found that adequate incineration of the samples is at  $700^\circ\text{C}$  for 12h and that the appropriate temperature and digestion time are  $250^\circ\text{C}$  and 30 minutes respectively. The matrix effect was evaluated, finding that, although there is no significant effect ( $p > 0.05$ ), the digestion mixture presents signals along the spectrum and therefore must be used as a target for the correction of spectrophotometric. The selection of the wavelength ( $\lambda$ ) was performed on a set of 50 samples corresponding to standards and faeces with known Cr content by variables of importance projection (VIP), applied using the parameters obtained by linear regression analysis of partial least squares (PLS), finding that the optimum  $\lambda$  for the analysis is 362 nm. With these results, an analysis protocol is proposed that optimizes the sensitivity for the quantification of the analyte in samples of bovine feces and foods with  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  content.

The method validation was carried out through the evaluation of selectivity, precision, linearity, accuracy, stability and limits of detection and quantification. It was found that the method is selective for faeces and food samples with  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  content and that there is no interference due to the matrix or the digestion mixture. The  $\text{TiO}_2$  was evaluated as interference and it was determined that its presence in the samples does not interfere significantly ( $p > 0.05$ ) with the recovery of Cr, so the scope of the method extends to samples with this marker. Linearity was evaluated by linear weighted regression between 3 and 25 mgCr / kg, finding an  $R^2$  of 0.996 and typical error of 0.02 for the model. The LOD and the LOQ were calculated from the absorption values obtained for the digester

mixture, finding an LOD of 2.9 mgCr / kg and a LOQ of 3.6 mgCr / kg. The intermediate precision was evaluated in five non-consecutive days and two analysts in three concentration levels, finding an overall RSD of 3.6%, so the method is considered precise. The accuracy was evaluated as percentage of recovery of Cr in a reference material made from faeces samples from animals not dosed with Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and enriched with 15mgCr / kgMS, finding a recovery of 98.99% ± 2.11%, so the method is accurate. To establish the maximum sample storage period, color stability was evaluated by absorption readings of H<sub>0</sub> samples enriched with 15 and 25mg / kg of Cr and stored for 180 days. It is found that there is no significant difference between the measurement made on day 1 and days 30, 60 and 180; but there is a tendency of increase in the last evaluation, so the maximum storage time is 60 days as suitable for the samples processed. It is concluded that the method is satisfactory for the quantification of Cr in faeces from animals used in digestibility assays with the external marker technique and that its scope extends to foods that contain it, as well as to samples of animals that have been dosed simultaneously with TiO<sub>2</sub>.

Finally, the optimized and validated method for the estimation of fecal production was implemented in an intake experiment with Holstein cows grazing kikuyo and supplemented with two types of commercial concentrates. The results obtained by the implemented method were contrasted with a reference method, finding a critical difference of 0.03 mgCr /kg, so it was determined that there is no difference ( $p > 0.05$ ) in the estimation of stool production and that the colorimetric method is appropriate for field trials. The forage intake rate was estimated using the internal markers FDNi, FDAi and MSi and the external one analyzed by both methodologies, finding that the PH values do not differ ( $p > 0.05$ ) so the variation of the intake reports is not linked to the method of quantification of Cr, and therefore, the colorimetric method can be applied indistinctly of the internal markers for ruminant digestibility tests.

**Keywords:** Validation, colorimetry, consumption, external marker, chromium dioxide, faeces production

# Contenido

Resumen .....	IX
Abstract .....	XII
Lista de figuras .....	XVII
Lista de tablas .....	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas .....	XIX
<b>1. Del cromo y su cuantificación .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Entendiendo la química del cromo .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Trazadores inorgánicos en nutrición animal .....</b>	<b>32</b>
<b>1.3 Evaluación de variables para cuantificación de Cr por colorimetría .....</b>	<b>37</b>
1.3.1 Efectos de la preparación de la muestra .....	38
1.3.2 Selección de la longitud de onda .....	41
<b>1.4 Validación del método analítico.....</b>	<b>46</b>
1.4.1 Selectividad .....	47
1.4.2 Precisión .....	48
1.4.3 Linealidad .....	49
1.4.4 Exactitud .....	52
1.4.5 Límites de detección y cuantificación .....	53
1.4.6 Estabilidad .....	55
<b>1.5 Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>1.6 Bibliografía .....</b>	<b>59</b>
<b>2. Optimización del método colorimétrico .....</b>	<b>68</b>
<b>2.1 Resumen .....</b>	<b>68</b>
<b>2.2 Introducción .....</b>	<b>69</b>
<b>2.3 Materiales y métodos .....</b>	<b>71</b>
2.3.1 Materiales .....	71
2.3.2 Ensayos de optimización .....	72

2.3.3	Selección de la longitud de onda.....	73
<b>2.4</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>75</b>
2.4.1	Efecto de los parámetros de digestión.....	75
2.4.2	Efecto matriz .....	77
2.4.3	Selección de longitud de onda .....	80
<b>2.5</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>85</b>
<b>2.6</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>87</b>
<b>3.</b>	<b>Validación de un método colorimétrico para la cuantificación de Cr en heces y alimentos .....</b>	<b>94</b>
<b>3.1</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>95</b>
<b>3.3</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>96</b>
3.3.1	Materiales .....	96
3.3.2	Preparación de muestras y soluciones stock.....	97
3.3.3	Tratamiento de residuos.....	98
<b>3.4</b>	<b>Plan de validación .....</b>	<b>98</b>
3.4.1	Selectividad.....	98
3.4.2	Linealidad y rango.....	99
3.4.3	Precisión intermedia.....	100
3.4.4	Exactitud .....	100
3.4.5	Estabilidad .....	101
<b>3.5</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>101</b>
3.5.1	Selectividad.....	101
3.5.2	Linealidad y rango.....	104
3.5.3	Precisión intermedia.....	107
3.5.4	Exactitud .....	109
3.5.5	Estabilidad .....	110
<b>3.6</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>112</b>
<b>3.7</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>113</b>
<b>4.</b>	<b>Implementación del método colorimétrico en la técnica del marcador externo en un sistema tradicional de pastoreo.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1</b>	<b>Resumen.....</b>	<b>115</b>
<b>4.2</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>116</b>

---

<b>4.3</b>	<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>117</b>
4.3.1	Animales y dosificación del marcador .....	117
4.3.2	Métodos.....	118
<b>4.4</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>119</b>
4.4.1	Correlación y concordancia de los métodos.....	119
4.4.2	Producción de heces y consumo .....	125
<b>4.5</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>130</b>
<b>4.6</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>131</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>135</b>
<b>5.1</b>	<b>Conclusiones Generales .....</b>	<b>135</b>
<b>5.2</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>137</b>



## Lista de figuras

Figura 1-1 Sistema Cr-OH para Cr (III) b. Sistema Cr-H <sub>2</sub> O-OH para Cr (IV). (Tomado de Chromium (IV) Handbook, Chapter 2, Chemistry, Geochemistry, and Geology of Chromium and Chromium Compounds, pp 73-74) .....	23
Figura 1-2 Rutas de exposición y acumulación de Cr en humanos (Adaptado A Critical Assessment of Chromium in the Environment, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, cap. 4, pp. 25) .....	29
Figura 1-3 Estructuras de los iones cromato (CrO <sub>4</sub> – 2) y dicromato (Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> – 2), tomada de Environmental Health Perspectives, Vol. 92, pp. 7-11, 1991 .....	40
Figura 1-4 Representación en dos dimensiones de componentes principales para un set de cuatro variables .....	43
Figura 1-5 Árbol de decisión para el cálculo de desviación en LOD y LOQ. Tomado de Guia Eurochem, cap. 6.22, pp 23, 2010 .....	55
Figura 2-1 Metodología para la selección de variables por PLS-VIP .....	74
Figura 2-2 Efecto de los parámetros de la digestión .....	76
Figura 2-3 Efecto matriz y temperaturas de digestión.....	79
Figura 2-4 a. Representación tridimensional de scores en las CPs. b. Representación de los datos en las dos primeras CP .....	81
Figura 2-5 Ajuste de la calibración del modelo PLS.....	82
Figura 2-6 Puntuaciones de la proyección de variables de importancia (VIP).....	84
Figura 2-7 Protocolo para la cuantificación de Cr por colorimetría.....	87
Figura 3-1 Análisis de selectividad para la determinación de Cr por Uv-Vis .....	102
Figura 3-2 Análisis de residuales para la regresión lineal simple (RLS).....	105
Figura 3-3 Modelos de regresión lineal simple y ponderado .....	105
Figura 3-5 Radios de diferencia de medias para el test de Tuckey con nivel de significancia p<0.05.....	111
Figura 4-1 Gráfico de medias y diferencias Bland-Altman .....	122
Figura 4-2 Estimación de la concordancia de datos emparejados .....	123
Figura 4-3 Bias de correlación y concordancia .....	124

## Lista de tablas

Tabla 1-1 Referencias representativas de estudios de digestibilidad con $\text{Cr}_2\text{O}_3$ en nutrición animal.....	35
Tabla 1-2 Valores de aceptación para la reproducibilidad recomendados por la AOAC ..	49
Tabla 1-3 Valores de aceptación para la exactitud recomendados por la AOAC.....	53
Tabla 2-1 Valores de absorción .....	77
Tabla 2-2 Resumen Estadísticos de las curvas de regresión .....	78
Tabla 2-3 Parámetros de las curvas de calibración estándar y adición de estándar sobre la matriz de trabajo .....	78
Tabla 2-4 Parámetros componentes principales .....	82
Tabla 2-5 Parámetros estadísticos del modelo.....	83
Tabla 3-1 Identificación de muestras utilizadas en análisis de selectividad .....	99
Tabla 3-2 Análisis de interferencias .....	103
Tabla 3-3 Parámetros estadísticos para el análisis de interferencias .....	103
Tabla 3-4 Análisis de varianza para los modelos de regresión lineal simple y ponderada .....	106
Tabla 3-5 Parámetros para los modelos de regresión lineal simple y ponderada .....	106
Tabla 3-6 Señales del blanco ( $y_0$ ) para estimación de LOD y LOQ .....	107
Tabla 3-7 Evaluación de la precisión intermedia .....	108
Tabla 3-8 Análisis de exactitud .....	109
Tabla 3-9 Evaluación de estabilidad del color .....	110
Tabla 4-1 Porcentaje de Cr total obtenido por cada uno de los métodos .....	120
Tabla 4-2 Parámetros del análisis de contraste para datos emparejados.....	121
Tabla 4-3 Parámetros de la regresión de Bland-Altman .....	122
Tabla 4-3 (Continuación).....	123
Tabla 4-4 Producción de heces obtenida con los tres métodos de cuantificación de Cr	125
Tabla 4-5 Prueba t para medias de dos muestras emparejadas entre los métodos B-C	126
Tabla 4-6 Comparación de promedios de consumo individual obtenido entre marcadores internos para los métodos concordantes.....	128
Tabla 4-7 Consumo de forraje calculado a partir de los marcadores internos .....	128

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
adjCV	Estimado del coeficiente de variación
bh-MB	Bosque seco-montano bajo
CMSf	Consumo de materia seca de forraje
CMSs	Consumo de materia seca de suplemento
CV	Coeficiente de variación
Eh	Potencial de óxido-reducción
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
FASS	Espectrofotometría de absorción atómica de llama
FDAi	Fibra en detergente ácido indigestible
FDNi	Fibra en detergente neutro indigestible
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
IRIS	Sistema Integrado de información de Riesgo
ISO	Organización Internacional de Estandarización
kgPV	kilogramo de peso vivo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
MSi	Materia seca indigestible
nm	Nanómetro
PCA	Análisis de componentes principales
PH	Producción de heces
pH	Escala de acidez - alcalinidad

RLS	Regresión Lineal Simple
RLW	Regresión Lineal Ponderada
RSD	Desviación Estándar Relativa
RSDG	Desviación Estándar Relativa Global
RSME	Cuadrado de las medias del error estándar
RSMEP	Cuadrado de las medias del error estándar de la predicción
UV-Vis	Ultravioleta y visible
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología
VIP	Proyección de variables de importancia

---

# 1. Del cromo y su cuantificación

El entendimiento de la química del cromo es primordial para comprender los procesos bioquímicos en el que este interviene, tanto en el medio ambiente como en los seres vivos. El cromo juega un papel esencial a nivel biológico y en el medio ambiente; sin embargo, la complejidad de su comportamiento bajo diferentes condiciones dificulta el conocimiento pleno de los mecanismos en los que este participa, conllevando a una discusión acerca del riesgo real generado por cada una de sus especies y de los riesgos que genera al ser usado en diferentes ámbitos. Este capítulo discute las características más importantes de las especies de cromo y su comportamiento en el medio ambiente, en sistemas biológicos y la importancia de estos parámetros en nutrición animal, específicamente de rumiantes, en donde se ha generalizado su uso en forma de compuestos solubles de  $\text{Cr}^{3+}$  como suplemento alimenticio y de óxido insoluble como marcador biológico para la estimación de consumo voluntario de forrajes. Se expone aquí de manera detallada la química del cromo y sus equilibrios, en las que predominan las especies  $\text{Cr(VI)}$  y  $\text{Cr(III)}$ , ligadas a diferentes fenómenos de transporte tanto a nivel metabólico como ambiental, donde las reacciones de óxido reducción y el medio en el que se encuentran determinan su comportamiento en sistemas biológicos.

Adicionalmente, se aborda el problema de la cuantificación de cromo en los centros de investigación en ciencias animales y se presenta la opción analítica de espectrofotometría para la determinación de  $\text{Cr(III)}$  en heces y alimentos como una alternativa de medición que tiene gran potencial en el área y cuya fiabilidad depende de factores críticos que hasta ahora han sido poco explorados en el área, tales como los efectos de la preparación de las muestras para el análisis y la selección de la longitud de onda para su determinación, mostrando que ambos factores son fundamentales para la implementación del método. También se hace la presentación de algunas herramientas

estadísticas que se pueden usar para la definición de factores determinantes en la sensibilidad y en la validación de los resultados obtenidos.

## 1.1 Entendiendo la química del cromo

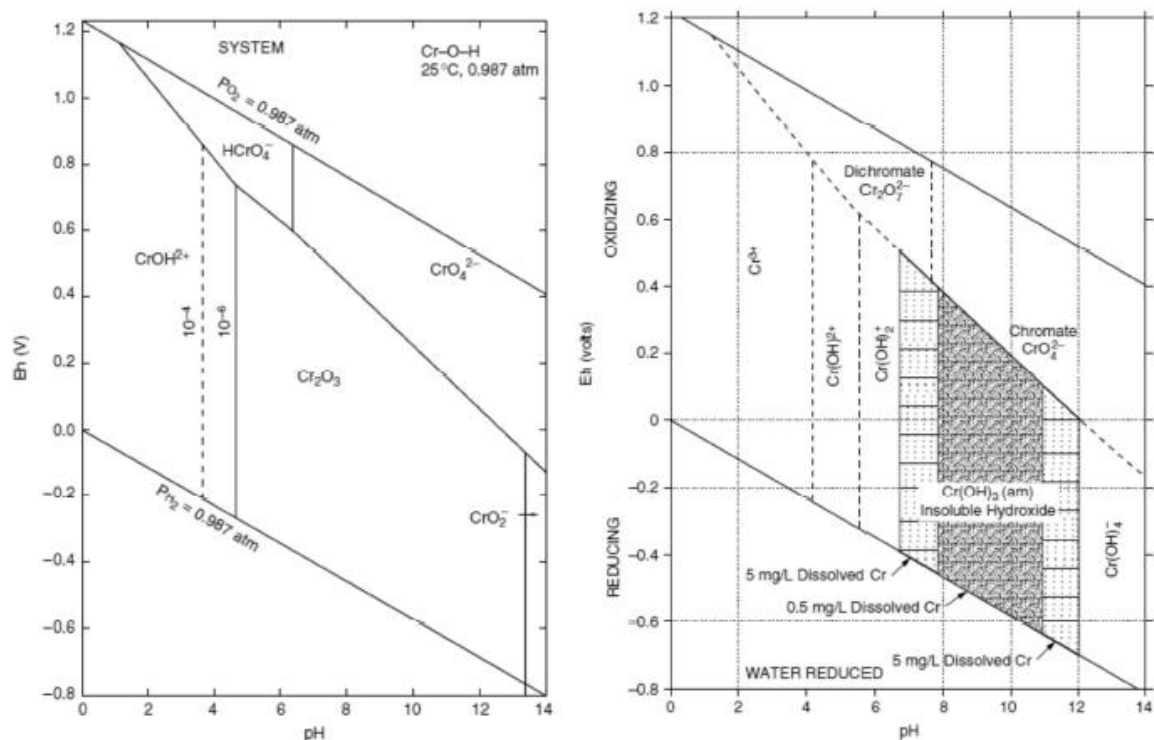
A nivel mundial, la presencia de cromo en suelos y aguas ha sido un problema significativo de contaminación y de salud pública, ya que algunos compuestos de Cr, están asociados a múltiples efectos toxicológicos en humanos y animales (World Health Organization, 2014). Una de las principales fuentes de contaminación proviene de prácticas industriales, y, en los años recientes, se cuenta como una fuente de contaminación el sector agropecuario debido al uso de este en algunos suplementos alimenticios y en agroquímicos; además, por la disposición inadecuada de residuos de Cr. Comparado con las fuentes industriales, las fuentes naturales generan una mínima parte de los aportes de cromo al medio ambiente, y el factor antropogénico derivado de las actividades agroindustriales también es mínimo (Kotas & Stasicka, 2000; Kimbrough et al., Creelman, & Mabuni, 1999; Davis & Olsen, 1995; Richard & Bourg, 1991). La compleja dinámica de su comportamiento hace que los diferentes compuestos de cromo se distribuyan en suelos, aire, agua e incluso alimentos, aunque las proporciones también pueden variar de acuerdo con las condiciones meteorológicas (Bielicka et al., 2005). Hasta poco menos de dos décadas, la concentración de cromo total a nivel mundial en suelos y aguas estaba estimada, dependiendo de la región geográfica, entre los 10 hasta los 520  $\mu\text{g/kg}$  (Costa & Klein, 2006; Dianyi Yu, 2011, Cefalu & Hu, 2004); mientras que reportes más recientes indican concentraciones entre 10 y 100  $\text{mg/kg}$  solo en suelos (Lukina et al., 2016), lo que sugiere que el aumento de cromo total ha sido considerable en las últimas décadas. Este incremento genera gran preocupación ya que el cromo puede existir en varios estados de valencia, entre -2 y +6, siendo el  $\text{Cr}^{+3}$  [Cr(III)] y el  $\text{Cr}^{+6}$  [Cr(VI)] las más comunes debido a la estabilidad de los compuestos que forman, los cuales exhiben características de transporte y toxicidad muy diferentes entre sí (Prado et al., 2016). Particularmente, en medios acuosos la especiación de cromo está dirigida por el potencial eléctrico o condiciones de oxidación (Eh) y por las condiciones de acidez o alcalinidad (pH). En términos generales, el Cr(VI) predomina bajo condiciones

oxidativas y el Cr(III) en condiciones reductivas. Estas dos formas del Cr muestran propiedades fisicoquímicas y características de movilidad yuxtapuestas que tienen incidencias cruciales en el medio ambiente y en sistemas biológicos (Jardine et al., 2013; Prado et al., 2016). Son tales sus diferencias, que mientras el Cr(III) es un elemento esencial en los seres vivos, el Cr(VI) exhibe una amplia gama de efectos tóxicos sobre los sistemas biológicos. De hecho, los compuestos de Cr(VI) son mucho más predominantes, biodisponibles y solubles que los de Cr(III), y su efecto sobre procesos metabólicos y ambientales son completamente diferentes.

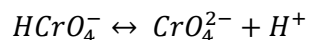
En sistemas acuosos, el Cr(III) puede estar presente en diferentes especies, tales como  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$  y  $\text{CrO}_4^-$  o precipitado como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ , en un amplio rango de pH y su estabilidad depende de las condiciones redox del medio (Rai et al., 1987); cuando su cristalización es amorfa, se forma el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (Palmer & Puls, 1994). En presencia de Fe (III) y condiciones ligeramente menos alcalinas, el Cr(III) también puede precipitar como un hidróxido bimetálico (Eary & Rai, 1991). Con Eh bajos, las especies mencionadas son los principales contribuyentes a la existencia del Cr (III), las cuales prevalecen con  $\text{pH} < 4$ . Adicionalmente, en sistemas naturales es común encontrar gran variedad de complejos formados con ligandos como grupos hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), cianuros ( $\text{CN}^-$ ), sulfocianuros ( $\text{SCN}^-$ ) y algunos halogenados, entre otros (Richard & Bourg, 1991). El único compuesto de cromo Cr(III) que existe como óxido es el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , por lo que su papel en procesos de óxido reducción es el más notable (Kimbrough et al., 1999); adicionalmente, su baja solubilidad es la principal razón por la cual su aporte como contaminante es mínimo y tienden a ser inamovibles en sistemas acuosos (Calder, 1988).

Bajo condiciones estándar, el comportamiento del cromo trivalente varía con la presencia de agua en el medio. En el sistema Cr-O-H (Figura 1-1a), la mayor estabilidad de las especies de Cr (III) se da en un amplio rango de condiciones de óxido reducción y pH. Con Eh entre +0.8 a -0.75 V y pH desde 5 hasta 13.5 (Figura 1-1a), el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  es muy insoluble, pero empieza a solubilizarse como  $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$  a pH por debajo de 5 y como  $\text{CrO}_2^-$  por encima de 13.5.

**Figura 1-1** Sistema Cr-OH b. Sistema Cr-H<sub>2</sub>O-OH. (Tomado de *Chromium (IV) Handbook, Chapter 2, Chemistry, Geochemistry, and Geology of Chromium and Chromium Compounds*, pp 73-74)



Por otro lado, para el Cr(VI), la zona de estabilidad ocurre en un rango de pH mucho más estrecho que para el Cr(III), por lo que la especie predominante es el cromato,  $\text{HCrO}_4^-$ . Bajo condiciones oxidativas, el Cr(VI) es muy soluble y se presenta principalmente en equilibrio formando el anión entre pH de 6 y 14:



A pH bajos, el  $\text{CrO}_4^{2-}$  existe como ácido crómico ( $\text{H}_2\text{CrO}_4$ ) y como monoácido ( $\text{HCrO}_4^-$ ). Cuando la concentración del primero es alta, se da la formación de dicromatos ( $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  o  $\text{HCr}_2\text{O}_7^-$ ), los cuales se reducen rápidamente a pH bajo o Eh alto. Si el pH es alto y el Eh es bajo, el  $\text{CrO}_4^{2-}$  es un oxidante pobre y permanece en el medio. Con  $\text{pH} < 5$ , para este sistema acuoso, el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  se desplaza hacia el catión.



Este comportamiento es el que rige la cinética de interconversión entre las especies y por ende es el factor determinante cuando se analiza el comportamiento del cromo en sistemas biológicos y ambientales (Motzer, 2004). Así pues, la oxido-reducción entre Cr(III) y Cr(VI) requiere que haya agentes oxidantes o reductores para que medie el movimiento de electrones. En el caso de ambientes acuosos, tales como los que se presentan en sistemas biológicos o ambientales, el oxígeno es el agente oxidante y el cromo requiere al donante de electrones; mientras que la reducción del oxígeno requiere al cromo como aceptor, por ende, para que la oxidación del  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  transcurra, se requiere del medio acuoso como fuente de oxígeno para la oxidación o la presencia de agentes oxidantes que en estos ambientes, no son tan comunes como para lograr una transformación importante.

Algunos compuestos presentes en plantas y suelos, como los ácidos húmicos, tienen ciertas características que facilitan la transferencia electrónica para las reacciones de oxido-reducción que involucran compuestos inorgánicos (Ratasuk & Nanny, 2007), por lo que, bajo condiciones reductoras, estos complejos orgánicos pueden aceptar o donar electrones directamente de los microorganismos o de las especies reducidas. Incluso, bajo condiciones anaerobias, y en presencia de Fe (II), la reducción del Cr(VI) es posible con  $\text{pH} > 5.5$ . Por otro lado, la reducción bacteriana se da en condiciones aeróbicas, donde el  $\text{HS}^-$  reducido puede donar electrones contribuyendo a que cambie la dinámica del flujo electrónico y con ello el potencial redox en el medio (Bauer & Kappler, 2009). Así, otros factores empiezan a tener un rol importante en los procesos de acomplejamiento del cromo, por lo que modelar su comportamiento puede llegar a ser dispendioso y puede haber incidencia de la materia orgánica en los procesos de fotorreducción del Cr(VI). Varios mecanismos de como ocurren estos procesos en presencia de radiación solar, hierro y materia orgánica han sido propuestos considerando que la presencia de radicales libres, tanto en suelos como en sistemas acuosos y en plantas, está estrechamente ligada a las reacciones de equilibrio de las diferentes especies de cromo (Kumar et al., 2016).

La labilidad del cromo en plantas les permite a estas acumular grandes cantidades de contaminantes sin que su crecimiento se vea particularmente afectado; algunas, incluso, que se encuentran cerca o en suelos con cargas metálicas importantes exhiben tasas de

crecimiento regulares para sus respectivas especies (Reddy et al., 2012). Aunque los mecanismos naturales que poseen las plantas para extraer el cromo son genéticas, también están influenciadas por las condiciones ambientales y en algunos casos las concentraciones pueden llegar a ser nocivas, pues sus respuestas a la especiación son diferentes. En algunos casos hay relación directa entre la acumulación y la tolerancia; mientras que en otros no hay correlación lineal (Marbaniang & Chaturvedi, 2014; Pal & Kundu, 2014).

Se ha dado la discusión respecto a los efectos aditivos que tiene la acumulación de Cr sobre la tolerancia a nivel metabólico, estructural y fisiológico de las plantas, sin que hasta ahora se haya llegado a una disertación en la que se establezca con claridad como son los mecanismos de difusión y equilibrio del Cr en su función biológica y los factores ligados a la toxicidad (Singh et al., 2013). Lo que sí está mucho más claro, es que los complejos formados por el Cr(III) y el Cr(VI) con ligandos orgánicos son los responsables de la biodisponibilidad del metal y del transporte en medios en los que regularmente las especies insolubles no se movilizarían, facilitando además las condiciones de pH óptimas para la bioabsorción de especies como  $HCrO_4^-$ ,  $CrO_4^{2-}$  y  $HCr_2O_7^-$  a través de las paredes celulares y afectando la bioabsorción de las especies benéficas catiónicas (Shadreck et al., 2005) que contribuyen a la protección celular contra el estrés oxidativo.

A pesar de que aún no está muy claro como las plantas pueden contener cantidades seguras de cromo dentro de sus organelas y a la vez protegerse a sí mismas de la toxicidad de estas concentraciones, se han llevado a cabo numerosas investigaciones que han permitido clasificarlas de acuerdo con sus estrategias de tolerancia de metales pesados en ambientes contaminados, categorizándolas como excluidoras, indicadoras y acumuladoras (Kumar et al., 2016), siendo estas últimas las más resistentes a la presencia de cromo, en donde se asume que participa en una gran cantidad de mecanismos a nivel organizacional metabólico, estructural o de desarrollo. La gran cantidad de variantes que se presentan en los mecanismos de bioacumulación y la diversidad de factores que involucran al cromo en sus diferentes formas, hacen que estos

procesos, además de complicados, sean de ambiguas interpretaciones en cuanto a toxicidad.

En todo caso, se ha establecido plenamente que las oxidaciones de las especies de cromo suceden en el ambiente que rodea las raíces y que posteriormente se da su transporte hacia tejidos (Kim et al., 2010), por lo que la biodisponibilidad de este se encuentra estrictamente ligada a las condiciones del suelo y a la solubilidad del compuesto en dicho medio. Por otro lado, la capacidad de ciertas plantas de transformar las especies insolubles en especies solubles, o de desintoxicar suelos mediante procesos internos, aportan aún más elementos de debate hacia la consideración del cromo como factor toxico en el medio ambiente, pues lo limita a las condiciones y concentraciones analizadas. Adicionalmente, la presencia de grupos hidroxilos en ciertos compuestos como las ligninas, pectinas y otros polímeros ramificados presentes en ciertas plantas, facilitan que el cromo sea transportado hacia medios acuáticos y biológicos, incluso en formas insolubles (Srivastava et al., 1999). Estas relaciones en las paredes celulares también están reguladas por las condiciones acidas del medio, en donde, a pH bajo, la protonación de los grupos funcionales es significativa y se incrementa la capacidad de transferencia electrónica, incrementando a su vez la presencia de especies de Cr(VI) mientras que las de Cr (III) disminuyen; otrora que a  $\text{pH} > 7.6$ , la desprotonación va favoreciendo la disminución de especies aniónicas (Shadreck & Mugadza, 2013).

Debido a las características particulares de las especies de cromo entre todos los metales, su comportamiento y concentración en diferentes medios lo hacen muy tóxico o relativamente inocuo. Si bien en plantas el cromo no es un elemento esencial, en otro tipo de organismos tiene un rol importante en procesos metabólicos, en donde se ha generalizado la aceptación de su uso como suplemento dietario para animales y humanos cuando se encuentra en forma de cromo trivalente y su efecto negativo sobre la salud en forma hexavalente. En general, para humanos y animales, el cromo es absorbido como Cr(VI) desde fuentes contaminantes o directamente por el tracto digestivo como Cr(III), principalmente en intestino. En la Figura 1-2 se presenta un esquema de las rutas de ingreso al organismo (Kimbrough et al 1999b). En cuanto al Cr

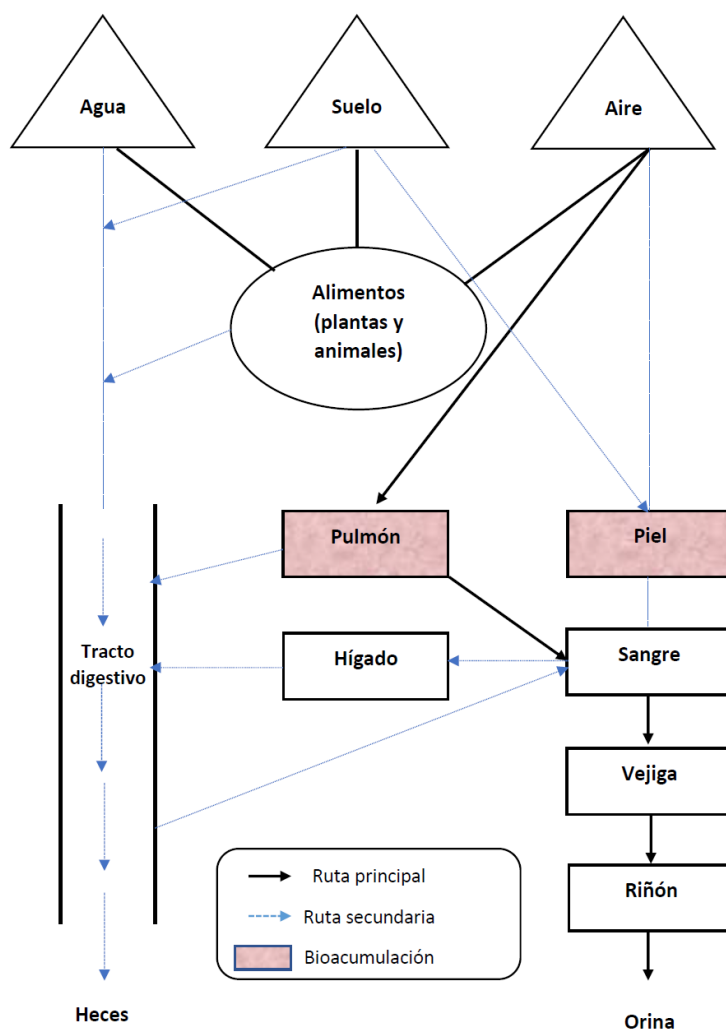
(III), su mecanismo de absorción es plenamente conocido; se estima que está directamente relacionado con el contenido de la dieta y que solo el 2% del cromo ingerido es absorbido en humanos a través de complementos vitamínicos o en animales como suplemento dietario, y sus cantidades están reguladas de acuerdo con la normativa de cada país (Eastmond, MacGregor, & Slesinski, 2008; Pechova & Pavlata, 2007). Dado que para estos suplementos se requiere que el cromo esté biodisponible, solo algunos compuestos de Cr (III) son aptos en alimentación sin riesgo de genotoxicidad como el que exhiben los compuestos de Cr (VI).

El cromo trivalente ha sido ampliamente estudiado por estar involucrado en varios procesos importantes para la actividad biológica como el metabolismo de la glucosa, la insulina, los lípidos entre otros, y su uso en suplementación animal ha mostrado efectos positivos en funciones reproductivas, de ganancia de peso y de crecimiento (Cohen, et al., 1993). A pesar de esto, también existen numerosos estudios en los que se han referenciado efectos genotóxicos sobre algunas especies sensibles y se han propuesto mecanismos que explicarían como se dan reacciones intracelulares en las que la naturaleza anfótera del cromo es el elemento clave para sugerir su actividad dañina (Dianyi 2015, Cohen, et al. 1993, De Mattia, Bravi et al. 2004).

En una recopilación realizada por Eastmond en 2008, se citan algunos de estos trabajos y se entrega un interesante contraste de conclusiones entre autores, que dejan entrever que para referirse a la toxicidad de las especies trivalentes aún falta mucho por explorar. Lo que, si queda mucho más claro en ello, es que en el tracto gastrointestinal la pobre absorción de especies de Cr (III), en especial su baja solubilidad y condiciones oxidativas, generan resultados mínimos para genotoxicidad. En general, los autores citados en ese trabajo concluyen que la suplementación de animales no representa peligro ni para los animales ni para los humanos que los consumen. Cuando se habla de mutagenicidad y evaluación de riesgo para las formas de Cr (III), se consideran los niveles de exposición necesarios para satisfacer los requerimientos nutricionales, las exposiciones mayores debido a suplementos reguladores de glucosa y exposiciones por aditivos en suplementación animal, por lo que el riesgo es mínimo.

Con otras especies, tales como el cromo hexavalente, la situación es diferente debido a su alta solubilidad y estabilidad en sistemas acuosos. La absorción celular del Cr (VI) se estima de acuerdo con los diferentes procesos de reducción a Cr (III), por lo que en términos generales su toxicidad está supeditada a la forma de exposición al riesgo. El estrés oxidativo que causa esta especie a nivel celular es la responsable del daño del ADN que causa cáncer, pues se ha demostrado que la especie intermediaria Cr(V) que se da durante la reducción en la célula interviene en la formación de aniones radicalarios de oxígeno y de radicales azufrados que son los que generan el daño en el ADN (Cohen et al., 1993).

**Figura 1-2** Rutas de exposición y acumulación de Cr en humanos (*Adaptado A Critical Assessment of Chromium in the Environment, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, cap. 4, pp. 25*)



En el caso de la exposición tóxica mediante ingestión, la especie hexavalente no tiene efectos cancerígenos cuando está en agua potable. El estándar de la EPA establece un nivel permisible en aguas de 0.1 mg/L (o 100 ppb) de cromo total sin especificar su especie o estado de oxidación, límite que se ha establecido no por su efecto debido a la ingestión sino por algunos efectos nocivos que se generan por la exposición cutánea (EPA 1998, Guertin, 2005). Estos límites están establecidos desde 2008 según la última comunicación emitida en el sitio oficial de la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés), y aunque se hace énfasis en que esto debe ser revisado a la luz de estudios más recientes, a la fecha no se registran modificaciones frente a la última emisión del Sistema Integrado de Información de Riesgo para las especies trivalentes y hexavalentes, bajo las cuales se rige la normatividad de varios países, incluido Colombia.

(EPA, 2018). Dependiendo de las regiones, las diferentes legislaciones consideran seguros niveles de exposición entre 1 y 100  $\mu\text{g/L}$  por contacto o ingestión y de 500  $\mu\text{g/m}^3/\text{día}$  por inhalación cuando se trata de salud ocupacional (Calder, 1988, USEPA, 1999, NIOSH 1999). El efecto de la ingestión de Cr (VI) no se considera en estos estudios debido a que los jugos gástricos lo reducen rápidamente a Cr (III) y por ende la forma hexavalente no es detectable en sangre u orina (ATSDR, 2000; Flegal et al., 2001).

En cuanto a la exposición dérmica, el contacto con suelos o aguas contaminadas puede llevar a procesos de absorción cutánea de Cr (VI), el cual es posteriormente transportado a sangre en donde ocurre la misma reducción que en el caso gástrico debido al pH del torrente sanguíneo. La contaminación aérea con cromo usualmente es la vía más usual de exposición a cromo que se da por la presencia de estas partículas disueltas en agua lluvia, principalmente por el equilibrio de vapor entre las formas solubles de este y el agua. Los efectos por inhalación de Cr (III) son ciertamente muy diferentes a los efectos del Cr (VI) debido a su naturaleza y solubilidad, permitiéndole al hexavalente ser absorbido en mucosas y pulmones mucho más rápidamente. Por ejemplo, en el caso de inhalación de Cr (VI) como óxido crómico ( $\text{CrO}_3$ ), se genera daño en la vía respiratoria mientras que con la misma exposición al óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), esta situación no se presenta (EPA 1998, Guertin, 2005). Se estima que entre un 53 y un 85% del Cr (VI) que ingresa vía aérea al cuerpo humano se absorbe en sangre y mucosas, mientras que entre el 15 y el 47% restante permanece en el pulmón (ATSDR, 2017b), por lo que esta vía de exposición se considera como la más importante al establecer la toxicología. Los efectos cancerígenos de esta especie se han asociado al cromato  $\text{CrO}_4^{2-}$  presente en partículas de sólidos o gotas en el aire que pueden ser inhaladas. Los demás efectos adversos sobre la salud diferentes al cáncer por esta vía, varían según su tiempo de exposición (agudos, intermedios o crónicos) y el nivel de riesgo mínimo (MRL), calculado en 0.000005  $\text{mg/m}^3$  (EPA 1998b, Guertin 2005b).

Los diferentes compuestos de cromo hexavalente pueden llegar a ser muy tóxicos y sus efectos sobre la salud humana y animal, han sido ampliamente estudiados, tal que hoy es claro que la estimación de sus grados de toxicidad se da en la medida en la que el Cr (VI) es reducido en el organismo a Cr (III). Lo que finalmente determina el comportamiento nocivo del cromo es la relación de equilibrio entre sus formas VI y III, pues cuando el primero es reducido extracelularmente debido a las condiciones de oxido-

reducción de los organismos, sus productos finales son especies de Cr(III) que no son absorbidas en tejidos y cuyas cantidades remanentes en el organismo no tiene efectos nocivos observables, mientras que la directa absorción de las especies de Cr(VI) está limitada a la vía de exposición al riesgo y su ocurrencia está dictaminada por las reacciones de conversión a nivel intracelular cuando este ha sido transportado al interior de la célula (EPA, 2017).

## 1.2 Trazadores inorgánicos en nutrición animal

La biodisponibilidad y los procesos metabólicos que sufren los nutrientes en las dietas ha recibido mucha atención por parte de los investigadores en nutrición ya que esta información permite conocer requerimientos para el diseño de dietas y alimentos, así como del mejoramiento de parámetros metabólicos y productivos. La forma química en la que los nutrientes se absorben con mayor eficiencia, la velocidad de paso y otros parámetros de retención deben ser considerados en nutrición. Una herramienta de gran robustez para este tipo de investigaciones es el uso de trazadores y biotrazadores, cuyo uso se ha generalizado en estudios de absorción intestinal, secreción y propulsión del bolo alimenticio. Existe una gran variedad de trazadores utilizados en nutrición humana y animal, cuya aplicación depende básicamente de los recursos de cada investigador y de las necesidades de precisión para cada caso. Las principales limitantes de estas técnicas dependen en gran medida de las interferencias que se dan en los procesos biológicos en los que participa. Su principal desventaja radica en el conocimiento limitado que se tiene de los procesos biológicos que se involucran durante el paso del marcador a través de los organismos. Debido a esto, se han establecido unos criterios básicos para que una sustancia sea utilizada como marcador (Bernard 1995), dentro de los cuales se debe tener en cuenta que su absorción sea mínima y que su degradación y estadía en el cuerpo no sea significativa. Adicionalmente, no debe tener ninguna influencia dentro de los procesos de movilidad de otras sustancias y que sus características de solubilidad puedan ser determinadas en condiciones fisiológicas. Se ha resaltado, además, la importancia del papel selectivo que cumple el intestino en la absorción de nutrientes y la necesidad de utilizar trazadores que no afecten la función enzimática ni la población de



células o microorganismos que cumplen esta función (Carr & Toner, 1984; Artursson, 1990). Usualmente, la principal forma de absorción de nutrientes se da por mecanismos de difusión pasiva, tanto paracelular como transcelular sobre sitios activos o por endocitosis (Balimane, Chong, & Morrison, 2000) por lo que el marcador debe ser invisible a estos mecanismos. Adicionalmente, cuando se liberan trazadores vía oral, la influencia del medio ácido estomacal y la permeabilidad intestinal juegan un rol importante, por lo que parámetros como balance de cargas, pH, polaridad, capacidad de ionización, potencial de oxido-reducción, entre otros factores fisicoquímicos que afectan la solubilidad o equilibrio del trazador, deben ser determinados (Ponnuvel, 2016). En 1985, Dressman y colaboradores, propusieron un parámetro para estimar las pérdidas del marcador debido a efectos de absorción llamado “potencial de absorción” (AP), el cual tiene en cuenta los coeficientes de partición de la sustancia a evaluar, las concentraciones de formas iónicas que puedan formarse a los diferentes pH y la solubilidad de las especies a la temperatura fisiológica del tracto digestivo, demostrando que hay una buena correlación entre estos parámetros y la fracción absorbida. La limitante de este parámetro es su utilidad para la predicción de permeabilidad, pues solo tiene en cuenta transporte pasivo. A pesar de ello, su aplicabilidad se extiende a modelos de predicción de absorción de diferentes sustancias usadas como marcadores, no solo en humanos sino también en perros, simios y bovinos (Willman 2007, Jacobs et. al, 2017).

Específicamente para estudios relacionados con el tracto digestivo o la nutrición, los marcadores más ampliamente usados cumplen con estos parámetros, siendo evaluados previamente en medios acuosos que simulan el ambiente digestivo y que son ricos en los nutrientes y electrolitos regulares de estos sistemas (Bernard 1995b). En términos generales, el marcador se dosifica vía oral o por infusión en un punto distal al de recolección. Para asegurarse que el marcador se homogenice en el tracto por efecto de la actividad motriz de este, normalmente se dan periodos de adaptación que varían según la especie y la naturaleza del trazador tal que permitan su recuperación completa. Una vez el marcador se estabiliza en el sistema, se debe conocer la rata de flujo de éste, teniendo en cuenta la cantidad dosificada y la concentración recuperada en la muestra o solución de prueba. Antiguamente, esta técnica era conocida como “*time-marker*” (Soergel, 1968) Sin embargo, su uso es muy limitado en cuanto a la dificultad de recolecta de heces o residuos urinarios y la precisión de la recolecta durante la etapa de

estudio. Dentro de los marcadores más ampliamente utilizados para procesos de perfusión intestinal se incluyen diferentes compuestos polivinílicos, indocianuro (ICG), bromosulfeína (BSP), polietilenglicol (PEG) y cromo marcado isotópicamente ( $^{51}\text{Cr}$ ), entre otros (Soergel, 1968; Brown 2005). Aunque estos marcadores tienen grandes ventajas para procesos de perfusión intestinal de monogástricos, algunos de ellos pueden diluirse durante su llegada a tracto posterior y por ende no son viables cuando de estudios de digestibilidad se trata. En este sentido, la búsqueda permanente de marcadores mucho más robustos se ha visto marcada por la exploración de compuestos que cumplan con las características previstas para su uso y que extiendan su alcance. Tal es el caso de la determinación de digestibilidad de nutrientes, en donde la técnica del trazador es una alternativa para solucionar el componente de recolección fecal que causa tantas dificultades técnicas, sobre todo cuando se trata de nutrición animal en los que la digestibilidad es un factor determinante de los parámetros productivos.

Actualmente, existen muchas tecnologías para estudios nutricionales tales como las nucleares, que utilizan marcadores isotópicos para la determinación de ingesta y absorción de nutrientes, balances de energía, control de actividad enzimática, digestibilidad de proteína y actividad genética entre otros (Wilkinson, 2016). Sin embargo, su uso requiere de gran infraestructura y procedimientos analíticos dispendiosos con los que usualmente los laboratorios de producción animal de Latinoamérica no cuentan (Hilburger et al., 2017). Otro tipo de marcadores con propiedades biológicas similares, entre los que se encuentran el iterbio como lactato o como cloruro se han popularizado, aunque su solubilidad en el aparato digestivo aún está siendo evaluado (Hassoun et. al, 2014). La desventaja de este método sigue siendo el alto costo de los estándares y la capacidad analítica e instrumental requerida para ser un buen reemplazo de los marcadores tradicionales (Delagarde, et. al 2010).

Por todo esto, a pesar de la gran variedad de marcadores de digestibilidad y de su gran precisión, se prefieren en ciencias animales otros marcadores inertes con precisión aceptable y cuyos costos de implementación y análisis son mucho más accesibles para los centros de investigación. Desde los años 50's hasta la actualidad, se ha preferido el óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) en estudios de ingesta de alimentos, ya que sus ventajas y

desventajas han sido exhaustivamente estudiadas y ampliamente documentadas tanto en humanos como en diferentes especies animales. Algunas de las referencias más representativas en las que el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  ha sido utilizado para múltiples especies en estudios de digestibilidad y tasa de pasaje se presentan en la Tabla 1-1. Para el caso específico de los rumiantes, la ingesta de alimentos o consumo es uno de los parámetros más sensibles en el *performance* productivo del animal y determinante en la estimación de la eficiencia de las pasturas que sirven de alimento, por lo que se constituye como uno de los mayores retos de los investigadores. Para estimar este parámetro, el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  ha sido una gran herramienta cuando se requiere conocer la digestibilidad del alimento y la producción de heces total en condiciones de pastoreo.

El comportamiento del  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  tanto en la fase líquida como en la particulada a lo largo del tracto gastrointestinal es homogéneo (Lindberg, J., 1985). Se ha especulado, que para diferentes especies el cromo dosificado como óxido trivalente puede acumularse y ser metabólicamente activo en sangre y órganos como hígado o riñones (Svecevicus et al., 2009), y que esa puede ser una de las posibles razones por las cuales su recuperación en heces no sea completa. Para evaluarlo, con frecuencia se utilizan peces por la facilidad de recuperar el marcador en el medio acuoso y por la alta capacidad de estas especies de acumular metales, por lo que el uso del isótopo  $^{51}\text{Cr}_2\text{O}_3$ , ha sido muy eficiente para mostrar que la recuperación del Cr(III) proveniente del marcador no es absorbido en torrente sanguíneo o acumulado en tejido (Sakita et al., 2015; Sakita et al., 2016). En el caso de herbívoros pequeños, cerdos y rumiantes, se han relacionado los porcentajes de recuperación en heces con la naturaleza del alimento que consumen (Ribeiro et al., 2008; Titgemeyer et al., 2001; Jacobs et al., 2017), con la frecuencia de recolección de las heces, con la forma de dosificación (Sampaio et al., 2011; Rocha et al., 2015), entre otros factores que inciden en la variabilidad de los reportes de porcentajes de recuperación.

**Tabla 1-1** Referencias representativas de estudios de digestibilidad con  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en nutrición animal

Año De Publicación	País	Autores	Especie (Nombre Común)
-----------------------	------	---------	---------------------------

---

1959	Inglaterra	Whitby y Lang	Humanos
1977	Estados Unidos	Cordova et al.	Rumiantes
1992	Inglaterra	Jagger et. al.	Cerdos
1993	Inglaterra	Price et al.	Primates
1996	Canadá	Scott y Boldaji	Aves De Corral
1996	Grecia	Yiakoulaki et al.	Caprinos
1997	Australia	Jones, Sena y De Silva	Cangrejos De Rio
1999	España	Ferret, et al.	Ovinos
2003	Alemania	Loehlein et al.	Elefantes
2004	Indonesia	Nur et al.	Abulones
2006	Portugal	Davies y Gouveia	Peces
2007	Brasil	Cavalieri et al.	Caninos
2011	Suiza	Franz, et al.	Conejos/Cavias
2015	Brasil	Sakita, et al.	Peces
2017	México	Guzmán, et al.	Ovinos

---

Una posible explicación para ello consiste en que hay otro tipo de pérdidas no cuantificadas en estudios con recolección de muestras fecales, como es el caso de la orina o de leche, en el caso de mamíferos. Adicionalmente, las correcciones por solubilidad y potencial de absorción de acuerdo con el pH del tracto digestivo, en general, no son tenidos en cuenta para estimación de producción total de heces, por lo que esto puede tener inferencia en la recuperación completa. A pesar de ello, los porcentajes de recuperación en las diferentes especies evaluadas varían entre un 80 y un 98%, por lo que sigue siendo una opción adecuada para estudios de digestibilidad siempre que se tenga en cuenta las variaciones que se pueden encontrar debido al uso de diferentes materiales bajo condiciones específicas (Lachmann & Febres, 2000). Con el fin de obtener valores fiables, se debe minimizar el error tanto en dosificación del marcador como en recolección de las muestras, y además, seleccionar un método analítico que presente una buena precisión y exactitud.

Bajo cualquiera de las metodologías de cuantificación que se adopten, los análisis de laboratorio requieren que el cromo recuperado en heces sea llevado a su forma hexavalente para determinación analítica, generando gran controversia por el potencial de toxicidad de los subproductos generados y una creciente desconfianza entre los investigadores para su uso, haciéndolo menos atractivo en el momento de la elección del marcador ideal (Myers et al, 2004; Titgemeyer et al., 2001b). Alternativas como el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) han sido exploradas desde hace varias décadas y se ha estudiado su tasa de liberación en monogástricos como ratas, cerdos, pollos y bovinos lecheros (Guzman-Cedillo et al, 2017; Morgan, Scholey, & Burton, 2014; Njaa, 1961; Titgemeyer et al., 2001c). Sin embargo, a la par con su creciente auge en ciencias animales, se ha puesto en duda su inocuidad, pues a pesar de su uso como aditivo en productos alimenticios y farmacéuticos, ha sido clasificado como “posiblemente cancerígeno en humanos” por la Agencia de Investigación del Cáncer, ya que se han encontrado efectos adversos relacionados con estrés oxidativo y daño celular. Actualmente, la autorización de uso como aditivo en alimentos se encuentra bajo revisión por parte de la Autoridad Europea de Alimentos para esta región (Skocaj et al 2011; EFSA 2016).

### **1.3 Evaluación de variables para cuantificación de Cr por colorimetría**

Dentro de los métodos usados para la cuantificación de cromo, se encuentran principalmente técnicas instrumentales de plasma inductivamente acoplado a detección de masas (ICPMS) u óptica (ICPSOES), y de emisión de llama (FASS). Estas técnicas tienen altos costos y requerimientos de infraestructura, por lo que una alternativa es la espectrofotometría ultravioleta y visible (UV-Vis), que presenta muchas ventajas en cuanto a sensibilidad y facilidad operativa. Una metodología para la determinación de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en heces por colorimetría fue propuesta por Czarnocki y colaboradores en 1960, y aunque ha sido ampliamente referenciada y adaptada a lo largo de los años, su sensibilidad ha sido cuestionada (Souza et al., 2013). Sin embargo, debido a los múltiples factores que inciden en el desarrollo del cromóforo implícito en el procedimiento y que no se tuvieron en cuenta desde su concepción, es necesario reevaluar algunos parámetros

con el fin de rescatar y aplicar este método que tantas ventajas ofrece frente a otras técnicas instrumentales.

La cuantificación del cromo proveniente de muestras fecales usando espectrofotometría se ha realizado de diferentes maneras a lo largo del tiempo, siendo la preparación de la muestra, la principal variación entre métodos, pues es un factor crítico a la hora de eliminar interferencias. Dentro de los procedimientos más referenciados para el tratamiento de las muestras, se encuentra la digestión ácida, cenizas seguidas de fusión alcalina o cenizas seguidas de digestión ácida con diferentes mezclas de ácidos, tiempos y temperaturas de digestión. Los resultados obtenidos por diferentes autores evidencian contradicciones entre los hallazgos reportados (Czarnocki, 1960; Kimura & Miller, 1957), siendo Czarnocki en 1960 quien sentó las bases para la estandarización del método. En 1979, Fenton y Fenton establecieron ciertos parámetros que mejoraron notablemente la cuantificación de cromo en heces y alimentos, marcando una pauta en la cuantificación del Cr en este tipo de matrices. Desde entonces, a pesar de que la técnica colorimétrica ha sido desplazada en el área de investigación en estimaciones de digestibilidad en rumiantes, este método se sigue usando ampliamente en otros sectores agropecuarios sin modificaciones hasta el día de hoy, aunque en algunos casos ha sido cuestionada por deficiencias en sensibilidad y precisión (Souza et al., 2013). Puesto que el óxido de cromo sigue siendo la mejor alternativa como marcador externo en ensayos de digestibilidad animal, el uso de la técnica espectrofotométrica es muy promisorio por su fácil implementación y resultados fiables, por lo que se deben explorar más a fondo los factores que inciden en su precisión para que el método pueda ser optimizado y utilizado sin temor a subestimar las concentraciones de cromo en heces.

### **1.3.1 Efectos de la preparación de la muestra**

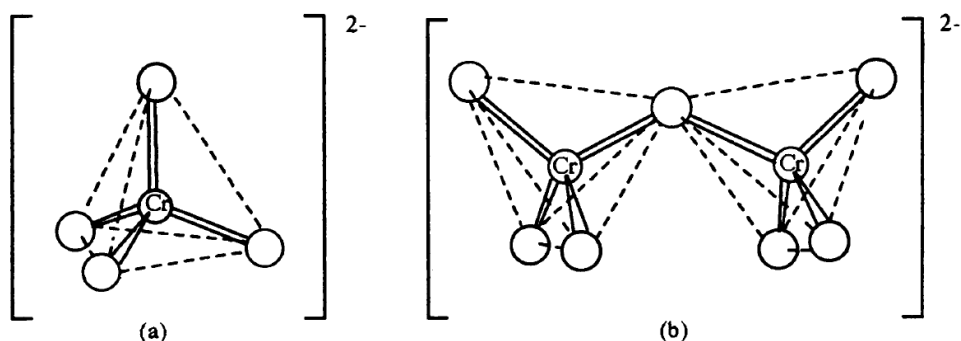
Uno de los factores determinantes en la recuperación del Cr mediante métodos espectrofotométricos es la digestión de la muestra, cuyos parámetros (composición de la mezcla digestora, temperatura y tiempo de digestión) han sido poco explorados en la

optimización de esta aplicación en particular. En cuanto a la composición de la solución digestora, se ha encontrado que la recuperación de metales es más efectiva cuando hay una eliminación apropiada de materia orgánica a través del uso de diferentes combinaciones de ácidos inorgánicos y su recuperación normalmente se evalúa a través de cuantificación por FASS (Sinex, Cantillo, & Helz, 1980). Para el cromo en muestras fecales, se ha utilizado tradicionalmente la composición propuesta por Fenton sin modificaciones, la cual fue evaluada recientemente para la recuperación de Cr en este tipo de muestras y fue comparada con otras mezclas usadas en este tipo de estudios, encontrando que las mejores recuperaciones se encontraban con la proporción de  $\text{HClO}_4\text{:H}_2\text{SO}_4\text{:H}_2\text{O}$  propuesta entonces (Souza et al., 2013). Por otro lado, la temperatura y el tiempo en la digestión son parámetros que hasta hoy no han sido reevaluados en este método y que son críticos, ya que a temperaturas muy altas la proporción de ácidos cambia alterando la sensibilidad de las lecturas y, alrededor de  $200^\circ\text{C}$ , se dan pobres desarrollos del color. En el trabajo realizado por Fenton y Fenton, se hace referencia a la importancia de la formación del azeótropo de  $\text{HClO}_4$  con agua, pero no tiene en cuenta que la presencia de molibdato en el medio juega un rol determinante en la resistividad del  $\text{HClO}_4$  incrementando la temperatura de formación de tales azeótropos. En esto, se encuentra una imprecisión, pues se aborda el problema de especiación y la importancia del punto de formación del azeótropo, pero la metodología propuesta indica que las digestiones se llevaron a cabo usando planchas de calentamiento con temperatura superficial hasta a  $300^\circ\text{C}$  y que la digestión debe darse hasta el desarrollo del color, que va de rojo a amarillo.

Sin embargo, la formación de los iones  $\text{HCrO}_4^-$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  (Figura 1-3) está ligada al potencial de oxidación en el medio y la coloración de las soluciones es un indicador de cuál es la especie formada. En rangos de pH ácido, se da la predominancia es de los iones  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , seguido de la formación de tri y tetra aniones  $\text{Cr}_3\text{O}_{10}^{2-}$  y  $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$ , cuya principal característica en solución es la coloración rojiza. A  $\text{pH} < 1$ , la especie predominante es  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ , mientras que entre 2 y 6 predominan  $\text{HCrO}_4^-$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ . La especie de coloración amarilla corresponde a  $\text{CrO}_4^{2-}$  y solo se da a  $\text{pH} > 6$ . Por ende, la presencia de todas estas especies durante los cambios de composición de la mezcla digestora al modificarse el pH con la temperatura, genera que la detección de especies

específicas no dependa únicamente del estado de oxidación y se presenten problemas en el momento de elegir longitudes de onda basados en estándares de referencia.

**Figura 1-3** Estructuras de los iones cromato ( $CrO_4^{2-}$ ) y dicromato ( $Cr_2O_7^{2-}$ ), tomada de *Environmental Health Perspectives*, Vol. 92, pp. 7-11, 1991



De hecho, la coexistencia de ellas en el medio genera cambios en las bandas de absorción del complejo formado respecto al de referencia, que usualmente es  $K_2Cr_2O_7$ , por lo que el desarrollo del color está ligado al pH y la formación de los enlaces Cr-O-Cr. En ese sentido, la formación del cromóforo estaría sesgado por la apreciación del analista, pues el tiempo establecido se presenta como un rango. Otro factor que no se tiene en cuenta durante el uso de este método es la presencia del molibdato de sodio dihidratado ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) que se usa para el desarrollo del color. En general, se hace referencia a este compuesto como catalizador: sin embargo, el molibdeno ha sido reconocido por formar polioxoaniones con metales debido su disponibilidad de orbitales *d* vacíos, dando lugar a la formación de complejos con otros aniones, incluidas las formas hexavalentes de cromo (Pope & Müller, 1991), por lo que juega un papel mucho más importante en esta reacción, ya que, en ausencia de este, el color no se desarrolla. Adicionalmente, la resistividad eléctrica de las soluciones que contienen  $HClO_4$  se



incrementa, haciendo que la formación de azeótropos se dé a mayor temperatura y por ende, este parámetro debe ser tenido en cuenta para el desarrollo del método. Considerando esto, es de esperarse que al cambiar los parámetros de digestión la sensibilidad para la cuantificación del cromo se pueda mejorar.

### 1.3.2 Selección de la longitud de onda

Es necesario, además, tener en cuenta que las longitudes de onda ( $\lambda$ ) a las que se ha trabajado convencionalmente están fijadas de acuerdo a la referencia ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), y puesto que no hay claridad en cuanto a la especie que se genera con este método y no se puede determinar con exactitud cuál es el complejo coloreado y el papel del Mo en el cromóforo, se debe reevaluar la  $\lambda$  óptima de trabajo teniendo en cuenta los máximos de absorción en los espectros obtenidos con estándares preparados bajo los mismos parámetros de la muestra. Para ello, se deben observar las posibles interferencias de la matriz a lo largo del espectro y decidir la  $\lambda$  más adecuada en donde se cumpla la ley de Beer-Lambert. Cuando existen matrices complejas, o los máximos de absorción en un espectro se presentan como grupos de longitudes, se debe evaluar la capacidad de predicción en una o varias  $\lambda$ , por lo que su selección es fundamental para una cuantificación óptima.

La herramienta más común para elegir la  $\lambda$  apropiada en espectros complejos es el **análisis de en componentes principales (PCA)**, que ha sido ampliamente usado en la reducción dimensional de espectros ya que tiene la capacidad de estimar un número infinito de espectros a partir de un set relativamente pequeño de muestras (Tzeng & Berns, 2005). Esta técnica se usa para reducir la cantidad de datos cuando hay una correlación, de manera que mediante combinaciones lineales de las variables originales (**X**), se puede describir la muestra en componentes principales (**Z**) tal que se obtengan correlaciones del tipo:

$$Z_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \cdots + a_{1n}X_n \quad (1.1)$$

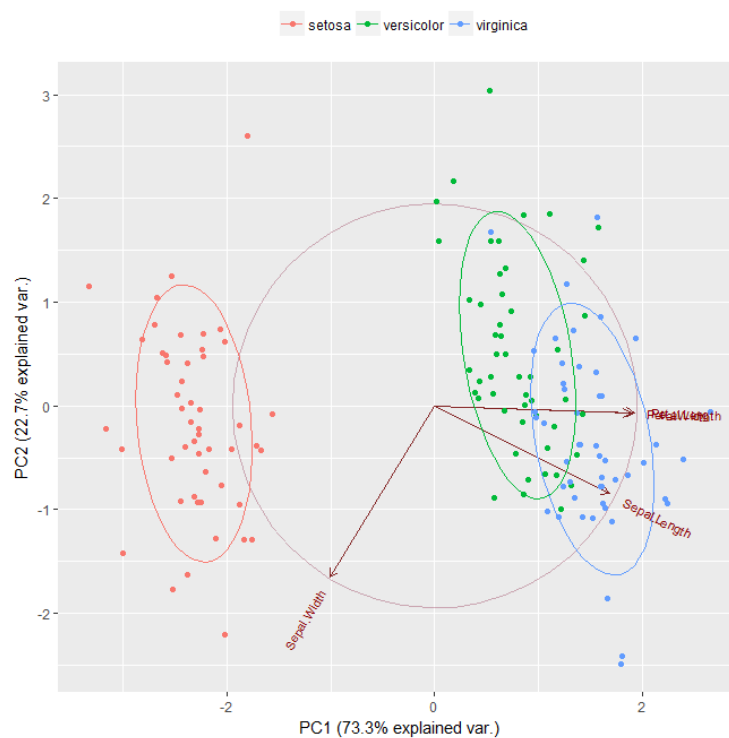
$$Z_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \cdots + a_{2n}X_n$$

De manera que el conjunto original de variables se transforma en otro conjunto en donde no exista correlación. En el caso de espectros, las variables se representan mediante matrices  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ , etc., que corresponden a los descriptores de las variables, es decir el set de intensidades de absorción a lo largo del espectro. Los coeficientes  $a_{11}$ ,  $a_{12}$ ,  $a_{13}$ , etc., representan las nuevas variables que no se encuentren correlacionadas entre sí, formando el otro conjunto de variables en las que el primer componente principal ( $CP_1$ ),  $Z_1$ , recoge la mayor parte de la variación; el segundo componente ( $CP_2$ ),  $Z_2$ , recoge la siguiente mayor parte y así sucesivamente hasta que ya no se encuentre correlación. Este sistema va reduciendo las variables originales a solo aquellas que tienen peso para la explicación de la varianza. Al definir cuáles son los CP, es posible representar los datos a través de la asignación de puntuaciones (*scores*) obtenidas en dos o tres dimensiones siempre que sea posible identificar grupos dentro de las observaciones. Este tipo de representaciones permiten contemplar la dirección de la variación y estadísticamente obtener la proporción de la varianza. Estos componentes, equivalen a los vectores propios de la matriz de correlación de las respuestas, de manera que a cada componente le corresponde un *eigenvalue* que indica la cantidad de variación asociada a este. En la figura 1-4, se ejemplifica el resumen de un análisis componentes principales para un set de datos popularizado en la literatura para el reconocimiento de patrones llamado Iris (Wold, Esbensen, & Geladi, 1987), que consta de clases linealmente separables. Este sencillo ejemplo ilustra el potencial de la técnica para explicar diferentes variables y la importancia de cada una de ellas en la variación. Así, para tres grupos de especies de flores (Setosa, Versicolour y Virginicia), se tiene una serie de mediciones que constituyen el conjunto de variables:

- SL: Longitud del sépalo en cm (Sepal.Length)
- AS: Ancho del sépalo en cm (Sepal.Width)
- LP: Longitud del pétalo en cm (Petal.Length)
- AP: Ancho del pétalo en cm (Petal.Width)

En la gráfica se ilustra como las cuatro variables se pueden representar en dos dimensiones, de las cuales se distinguen claramente los grupos de especies que se resaltan en los elipsoides. Los vectores, que representan los CP, muestran que hay dos que explican la mayor variabilidad, es decir que el  $CP_1$  explica el 73.3% de variabilidad y el  $CP_2$  el 22.7%, es decir que estas dos componentes contienen el 96% de las varianzas para cada una de las variables. Se puede observar como las variables AP y LP tienen correlación y su variabilidad en todos los grupos de especies está determinada por el primer componente, que además explica una porción importante de la variabilidad de LS.

**Figura 1-4** Representación en dos dimensiones de componentes principales para un set de cuatro variables



Cuando se trata de un proceso de selección de variables espectrales, en este caso la  $\lambda$  adecuada cuando los máximos de absorción se presentan como *cluster*, también se puede realizar con métodos de clasificación y se determina a través de conjuntos de espectros compuestos por estándares y muestras con contenido del analito que tengan concentración conocida. Dentro de los métodos de selección de variables que mejores ventajas ofrece para ese tipo de análisis se encuentra el método de filtro, el cual solo considera propiedades intrínsecas de la independencia de la clasificación. Es decir, si la variable es independiente, el análisis es univariado y considera cada variable como independiente de las demás; mientras que el análisis multivariado, supone la dependencia de unas variables con otras (Akarachantachote, Noppamas Chadcham & Saithanu, 2014).

El PCA constituye la base del análisis multivariado y aunque el tratamiento matricial puede llegar a parecer engorroso, los resultados que se pueden obtener como representaciones geométricas, facilitan su entendimiento y aplicación en diferentes áreas del conocimiento; por otro lado, en la actualidad, el desarrollo de software libre hace de esta una herramienta invaluable a la hora de procesar grandes cantidades de información, ya que los paquetes de datos contienen funciones que facilitan la aplicación de la herramienta.

Otra herramienta estadística para la selección de variables es el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), cuya ventaja radica en que es aplicable a variables ruidosas, colineales o con valores faltantes. Se basa en el uso de componentes que son transformaciones lineales de las variables de predicción originales y cuya característica es la alta covarianza que tienen con las variables respuesta. En el caso de varias componentes, el modelo lineal tiene la forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1.2)$$

donde  $\mathbf{T}$  representa la matriz de los nuevos componentes (*scores*) y  $\mathbf{P}^T$  los pesos (*loadings*) y  $\mathbf{E}$  el error o residual. De esta forma es posible representar una matriz  $\mathbf{X}$  con una de menor dimensión ( $\mathbf{T}$ ) que queda caracterizada por vectores  $\mathbf{p}^t$  y vectores  $\mathbf{t}_1 \mathbf{t}_2 \dots$  etc., explicando la variable de respuesta con su respectivo error máximo asociado. Este procedimiento está constituido por una serie de algoritmos descritos en detalle por

diferentes autores (Alciaturi et al, 2003) y existen como funciones dentro de paquetes de software que facilitan su cálculo de manera que al definir cuáles son las variables dependientes e independientes, la interpretación de los resultados resulta sencilla facilitando la selección de variables relevantes con el estudio de su peso y su error.

La estimación del error para cada espectro se hace con la media cuadrática RSME (por sus siglas en inglés),

$$RSME = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (1.3)$$

donde  $y_i$  es la variable respuesta y  $\hat{y}_i$  su estimado mediante el modelo para un numero  $n$  de muestras. Con el fin de estimar la predicción del error para este modelo se hace necesario realizar su validación, por lo que usualmente se utiliza un set de espectros para calibrar el modelo y otro para probarlo (*Leave n objects out – LNO*). Otra manera que se considera más robusta es la validación cruzada que puede hacerse con todo el set de espectros para calibración dejando solo una muestra por fuera y reiterando el procedimiento para cada una de las muestras que contiene el set tal que siempre se queda una por fuera (*Leave one out-LOO*).

Es común que una vez se tienen las CP, se califique su relevancia con el uso del parámetro conocido como **Importancia de Variables de Proyección (VIP)**, que consiste en un criterio que mide el poder predictor de las variables con mejor ajuste obtenidas mediante el PLS e incluye la dependencia de las variables como si fuera un análisis multivariado. El cálculo del puntaje VIP se obtiene para cada componente  $a$  teniendo en cuenta el peso del predictor  $j$ -ésimo ( $w_{aj}$ ) en dicha componente y la fracción de la varianza en  $y$  explicada por la componente  $a$  descrito por  $R^2(y, t_a)$ :

$$VIP = \sqrt{\frac{\sum_{a=1}^h (R^2(y, t_a) (w_a / ||w_{aj}||)^2)}{(1/p) \sum_{a=1}^h (R^2(y, t_a))}} \quad (1.4)$$

Este criterio, toma un valor crítico tal que todas las variables significantes adquieren valores iguales o mayores a 1 y la más relevante será aquella que tenga el mayor puntaje (Noppamas et al, 2014).

Este tipo de herramientas en espectrofotometría ha sido ampliamente referenciado y muestra resultados satisfactorios en la elección de longitudes de onda para matrices complejas o análisis de componentes simultáneos en una sola muestra (Takahama & Dillner, 2015; Tzeng & Berns, 2005), permitiendo seleccionar parámetros importantes cuando se tiene duda de la capacidad de predicción de un modelo a través del uso de espectros de referencia con valores conocidos. Cuando se requiere desarrollar y estandarizar un método espectrofotométrico en una matriz compleja, la base estadística es fundamental para demostrar la validez de las decisiones tomadas y para el aseguramiento metrológico de los resultados.

## **1.4 Validación del método analítico**

Cuando se modifica o se emplea un método nuevo para la cuantificación de analitos, es necesaria la estandarización de los procedimientos descritos en él para que su alcance específico garantice el control de la calidad analítica. La posterior validación del método es una herramienta que permite, además, el aseguramiento de los resultados. De acuerdo con diferentes definiciones establecidas por organismos internacionales de estandarización como la ISO y VIM, se puede definir la validación de un método analítico como el proceso para definir un requisito analítico (Magnusson & Örnemark, 2014). En términos de normativas estandarizadas, se entiende como la capacidad de reproducir un resultado mediante una serie de parámetros que permitan confirmar a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, que se cumplen los requisitos especificados para un uso previsto (Icontec, 2005). Así, un laboratorio puede adaptar un procedimiento validado o adquirir un sistema de medida para realizar la cuantificación de un analito dado sin que se realice la confirmación de la capacidad para aplicar dicho método. Esto es lo que se conoce como verificación (Magnusson & Örnemark, 2014b), lo que conlleva a que el laboratorio deba realizar algún trabajo experimental que demuestre que dicho método funciona para ciertos parámetros.

A pesar de que existen varias guías para la validación de métodos analíticos, no existe una única forma de validar un método ya que los parámetros se definen de acuerdo con

las técnicas y a la naturaleza del analito que se desea cuantificar. En la mayoría de casos, se contemplan ciertos parámetros de validación enmarcados dentro de la legislación para productos comerciales, desechos industriales que afectan el medio ambiente, farmacéuticos o alimentarios, marginando otras aplicaciones que por su naturaleza no están incluidas en la legislación y por ende no se toman como obligatorias en el momento de cuantificar analitos (Reichenbacher Mandred, 2011). Sin embargo, existen guías técnicas que presentan de manera sistemática los pasos necesarios para la validación de métodos analíticos a través de la aplicación de una secuencia metodológica para el desarrollo de la validación (Sandoval, 2010). Siguiendo esta secuencia, un plan de validación debe contemplar el alcance del método, el diseño experimental para su desarrollo, el establecimiento de las muestras a ser analizadas, reactivos, matrices, certificados de control y calidad, parámetros de las pruebas, número de análisis que se deben realizar por cada parámetro o prueba, criterios de aceptabilidad, personas responsables de los procedimientos, muestras y reactivos y en general responsables de la aplicación del método con el fin de que se garantice la idoneidad de los resultados y de los laboratorios. En general, las pruebas a realizar deben estar enfocadas en evaluar el método en términos linealidad, selectividad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, exactitud y precisión, tomando como criterios de aceptación los mismos que son aplicables a la técnica (Reichenbacher, 2011).

### **1.4.1 Selectividad**

Este parámetro, consiste en relacionar el grado de interferencia que puedan tener sustancias que no son de interés dentro de la matriz en donde se encuentran los analitos a cuantificar. Con este parámetro se mide la capacidad del método para identificar o cuantificar los compuestos de interés frente a agentes exógenos y bajo las condiciones de preparación de la muestra. Dado que la sustancia de interés en el método a desarrollar está relacionada con la matriz, la forma más adecuada de determinar este parámetro es utilizando en los análisis la matriz original de la muestra, de manera que se puedan definir rápidamente las interferencias a las que haya lugar durante el proceso de validación con el fin de determinar la presencia de sustancias que puedan enmascarar, ocultar, interactuar o interferir en la determinación del analito de interés en la muestra; de igual forma, si las concentraciones dependen de medidas subjetivas como las

observaciones visuales, debe determinarse el margen de error de calibración en los niveles más bajos, tal que se garantice el perfecto funcionamiento del método y que el efecto de las impurezas o sustancias no relacionadas no presenten ningún tipo de afectación para los resultados a reportar.

En el caso de análisis espectrofotométricos, la evaluación de la selectividad y las interferencias se pueden realizar a través de la comparación de espectros. Aunque existen varias formas de evaluar la selectividad de un método, cuando se trata de matrices complejas para las cuales no existen materiales de referencia certificados, es común hacer uso de la matriz libre del analito, a la que se le adiciona una concentración conocida de este o de la sustancia que constituye la interferencia que se quiere evaluar, y, posteriormente, comparar los espectros con el fin de definir si la matriz o el interferente tiene algún efecto sobre la medición.

### **1.4.2 Precisión**

Este parámetro mide el grado de precisión que tiene el método en una serie de mediciones repetidas del mismo analito, realizadas en las condiciones preestablecidas en el protocolo del método. Con esto se ven reflejados los errores aleatorios que se producen durante cualquier medición. Para esto, se definen dos conceptos que van a ser relevantes en el momento de analizar la precisión. El primero es la repetibilidad, que consiste en mostrar que las condiciones son repetibles cuando el mismo analista procesa y mide las muestras el mismo día con el mismo equipo o con los mismos materiales manteniendo constantes todas las condiciones para los análisis. Cuando existen cambios de estas condiciones o de analista, se mide entonces la reproducibilidad del método, que es el segundo criterio de precisión; esto es, que tan variable es el método cuando la medición la realiza otro analista, otro día con otras condiciones. El criterio para definir la precisión de un método es el coeficiente de variación (%CV) o desviación estándar relativa global (%RSD). De acuerdo a la guía de oficial de métodos analíticos (Latimer & AOAC International, 2012), los niveles de precisión están dados de acuerdo a las unidades y concentraciones esperadas.



También se puede considerar la precisión intermedia como una combinación de esos factores en los que se determina la variabilidad entre analistas, en diferentes días y a diferentes niveles de concentración del analito en las muestras, con el fin de obtener la mayor variabilidad posible relacionada con las diferentes condiciones. El criterio de aceptación para análisis fisicoquímicos recomendada por la AOAC cuando no se puede realizar análisis inter-laboratorios, tiene en cuenta la cantidad esperada del analito en las muestras y la asocia a un máximo de variación en términos de %RSD, tal como se muestra en la tabla 1-2. Otras guías como la Eurochem, recomiendan que el criterio se exprese como una medida de la varianza entre grupos usando un ANOVA. En cualquier caso, la mayoría de las guías coinciden en que la evaluación de este parámetro se debe realizar con un mínimo de seis repeticiones que cubran todo el rango de concentraciones esperado en las muestras.

**Tabla 1-2** Valores de aceptación para la reproducibilidad recomendados por la AOAC

Concentración	(RSDR%)
100 %	2
10 %	3
1 %	4
0.1 %	6
0.01 %	8
1 ppm	11
100 ppb	16
1 ppb	32

### 1.4.3 Linealidad

Se dice que un método es lineal si la respuesta del equipo o la señal obtenida tiene una relación directamente proporcional con la concentración del analito dentro de un rango específico de trabajo, por lo que la aplicación de este criterio tiene implícita la determinación de un rango de concentraciones que contenga los valores esperados en las muestras de trabajo. Principalmente se usan ajustes estadísticos para determinar la linealidad de un método, el más usado de ellos, coeficiente de correlación, se tiene como preferido para la determinación de este parámetro, sin embargo, este criterio depende de

cómo se realizó dicha curva de calibración y puede arrojar factores que aparentemente son válidos cuando se realiza sin tener en cuenta, por ejemplo, la frecuencia de los puntos usados.

Cuando se determina que la relación es lineal entre la señal analítica ( $y$ ) y la concentración ( $x$ ), se busca calcular la recta que minimiza la desviación en la dirección de  $y$  entre los puntos experimentales y los calculados, por lo que se requiere minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, que se toma de esta manera ya que algunas desviaciones o residuos pueden ser negativos. Esto se conoce como el método de los mínimos cuadrados y se basa en el principio de que la línea debe pasar por el “centro de gravedad” de los puntos ( $x, y$ ), para lo cual, se calcula la pendiente  $b$  como:

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.5)$$

y la ordenada  $a$  de la recta en el origen:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (1.6)$$

que constituyen la recta de regresión en la que se supone que los errores ocurren en la dirección de  $x$ . Los errores aleatorios de  $b$  y  $a$  se consideran calculando el estadístico  $S_{y/x}$  para la estimación de los errores aleatorios sobre  $y$ :

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n-2}} \quad (1.7)$$

donde la diferencia  $y_i - \hat{y}$  corresponden a los residuos de los valores ajustados de  $y_i$  calculados a partir de los valores de  $x$ . Posteriormente se realiza el cálculo de las desviaciones estándar del pendiente  $S_b$  y de la ordenada  $S_a$ :

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.8)$$

$$S_a = \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.9)$$

Los valores  $S_b$  y  $S_a$  se utilizan para estimar los límites de confianza de la pendiente y de la ordenada para un nivel de confianza especificado para un valor  $t$ :

$$a \pm t_{(n-2)} S_a \quad (1.10)$$

$$b \pm t_{(n-2)} S_b \quad (1.11)$$

Con esto, es posible calcular la concentración de cualquier analito para el que se conozca el valor de la señal y su error asociado. Este modelo de regresión supone que los errores sobre  $y$  son constantes, es decir, que los datos son **homocedásticos**.

Sin embargo, en la práctica, es usual encontrar que la dispersión aumenta con la concentración, es decir que son **heterocedásticos**, por lo que en este caso el modelo de regresión debe hacerse ponderado.

En este caso, el error aleatorio del resultado surge de la combinación de factores que contribuyen a que este se asocie a la concentración, por lo tanto, al aumentar  $x$ , el error aumenta y por ende se debe recalcular la pendiente y la ordenada en término de las ponderaciones individuales ( $w_i$ ) para cada uno de los puntos ( $x, y$ ):

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum s_i^{-2} / n} \quad (1.12)$$

$$b_w = \sqrt{\frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \widehat{x}_w \widehat{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \widehat{x}_w^2}} \quad (1.13)$$

$$a = \widehat{y}_w - b \widehat{x}_w \quad (1.14)$$

En las ecuaciones (1.13 y 1.14),  $\widehat{x}_w$  y  $\widehat{y}_w$ , las nuevas coordenadas del centro de gravedad son

$$\widehat{x}_w = \sum_i w_i x_i / n \quad (1.15)$$

$$\widehat{y}_w = \sum_i w_i y_i / n \quad (1.16)$$

Estas nuevas coordenadas son muy similares a las originales, pero pasan más cerca del centro de gravedad que las del gráfico no ponderado permitiendo que la recta pase más cerca del origen, conllevando, además, a que los límites de confianza sean más estrechos.

En este caso, las desviaciones estándar de la predicción se calculan como:

$$S_{x_w} = \frac{S_{(y/x)w}}{w_0} \left\{ \frac{1}{w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \hat{y}_w)^2}{b^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n x_w^2)} \right\}^{1/2} \quad (1.17)$$

Donde los errores aleatorios de la ponderación se calculan según:

$$S_{(y/x)w} = \left[ \frac{\sum_i w_i ((y_i - \hat{y}_i)^2)}{n-2} \right]^{1/2} \quad (1.18)$$

Para llevar a cabo el análisis de linealidad, es necesario tener al menos cinco niveles de concentración diferentes que cubran el rango esperado en la muestra y preferiblemente por triplicado. El criterio de aceptación para la linealidad debe ser un coeficiente de correlación  $r > 0.99$ .

#### 1.4.4 Exactitud

Aquí se hace referencia a la diferencia entre los resultados esperados y el valor de referencia aceptado. Con este parámetro se refleja el error sistemático y se determina utilizando una matriz conocida y un material de referencia certificado; sin embargo, tal como en el caso que se abordará, no siempre se dispone de este tipo de estándares para los análisis dado que usualmente los analitos de interés se encuentran contenidos en matrices complejas. En Estados Unidos, existe el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) que fabrica este tipo de materiales para ofrecer alternativas a los patrones de referencia autorizados. Cuando no se cuenta con matrices certificadas o sintéticas, se debe usar para los análisis la matriz problema y el patrón primario certificado o trazable. Generalmente, la exactitud se determina analizando muestras a las

que se les ha añadido diferentes cantidades del analito dentro del rango de trabajo y que sean diferentes a los niveles usados para crear la curva de calibración. Se compara entonces el aumento de la señal y se compara con la señal obtenida de la recta de calibrado. Usualmente se recomienda que la exactitud sea expresada en términos de porcentaje de recuperación (%R) y el intervalo de aceptación propuesto por la AOAC (Tabla 1-3) es el más ampliamente utilizado en validaciones. Se recomienda realizar la evaluación de este parámetro a través del análisis en al menos tres niveles de concentración.

**Tabla 1-3** Valores de aceptación para la exactitud recomendados por la AOAC

<b>Concentración <i>target</i></b>	<b>Límites de recuperación (%)</b>
100%	98–101
10%	95–102
1%	92–105
0.10%	90–108
0.01%	85–110
10 ppm	80–115
1 ppm	75–120
10 ppb	70–125

### 1.4.5 Límites de detección y cuantificación

Se define el límite de detección (LOD) como aquella concentración en la que la magnitud de la medida es mayor a su incertidumbre, es decir, la mínima concentración en la que hay una señal de respuesta, pero en la que no es posible la cuantificación. Hay diferentes formas de calcularla, la más básica es utilizando la curva de regresión obtenida en el análisis de linealidad y suponer que la señal del blanco ( $y_b$ ) es la mínima detectable y se calcula la concentración despejando el valor de la variable  $x$ , lo que sería diferente al límite de detección del instrumento si se analiza como blanco la matriz libre de analito sometida al método que se está validando (Latimer & AOAC International, 2012b). Usando la señal del blanco, también es posible calcularlo en términos de la señal y su desviación estándar ( $S_0$ ) (Miller & Miller 2002):

$$LOD = y_b + 3S_0 \quad (1.18)$$

Algunas guías como la del ICH y la IUPAC, siguen el LOD usando el valor de la pendiente de la recta de calibrado y la desviación estándar de los blancos  $S_0$ , o del intercepto de la recta  $S_b$ :

$$LOD = \frac{3.3 * S_0}{b} \quad (1.19)$$

$$LOD = \frac{3.3 * S_b}{b} \quad (1.20)$$

La elección del modelo de cálculo para el LOD está sujeta a la desviación que se tenga en valores muy bajos de concentración o a los efectos relacionados con la matriz. En la guía Eurochem, se propone un método para escoger la forma de calcular la desviación de los blancos con un diagrama de flujo (Figura 1-5) en el que se tiene en cuenta si los resultados de las observaciones del blanco serán corregidos con el uso del blanco o no, calculando primero la desviación con los resultados de réplicas de una muestra de concentración cercana a cero, ya sea sin corrección de blanco ( $n$ ) o con una corrección de blanco ( $n_b$ ) aplicada a todos los resultados según lo especificado por el método. Usando este método, el  $LOD$  se toma como  $LOD = 3 * S'_0$ .

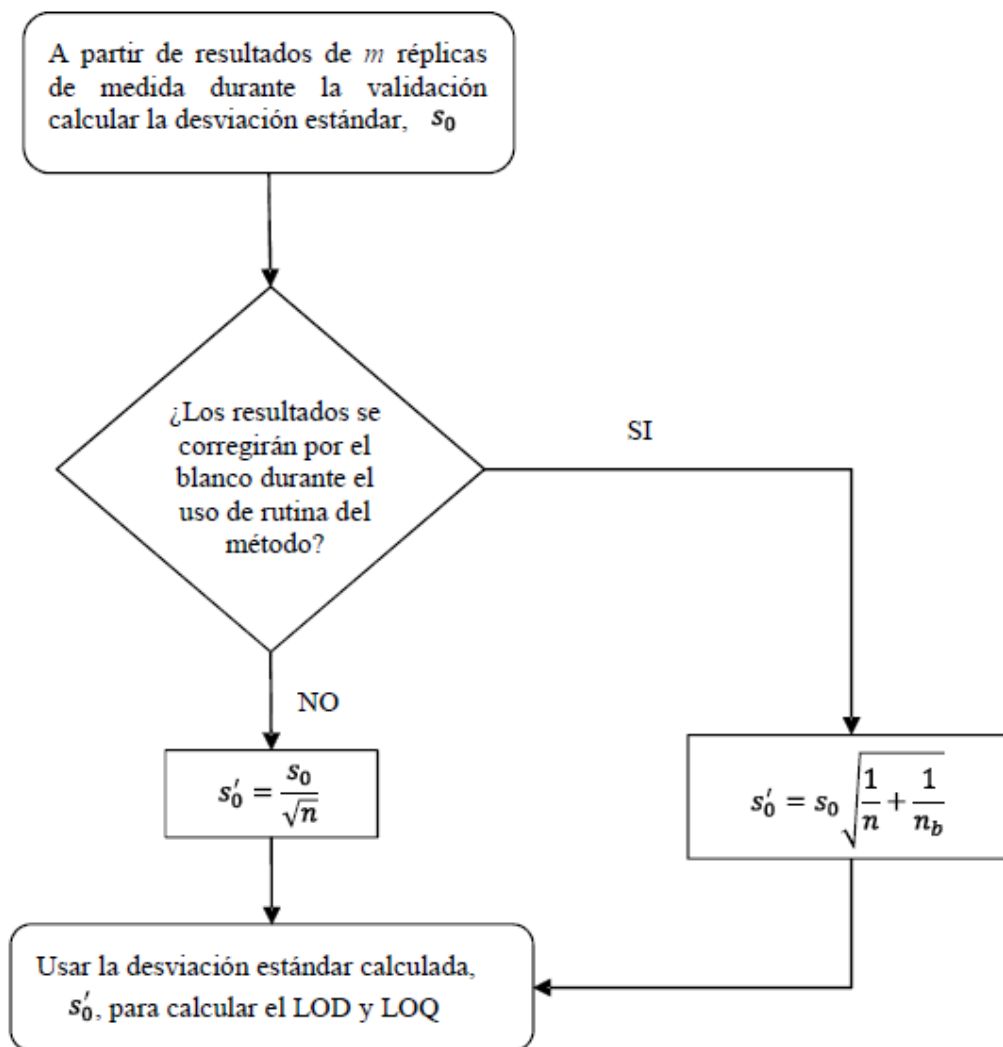
Para el límite de cuantificación  $LOQ$ , definido como la cantidad mínima cuantificable con precisión aceptable, se debe observar la metodología usada para el cálculo del  $LOD$ . Si se hace uso de la señal del blanco (Ec. 1.18), el  $LOQ$  se calcula como  $LOQ = y_b + 10S_0$ . En caso de que se utilicen los parámetros de la recta de regresión, los cálculos se hacen de acuerdo con las ecuaciones 1.21 y 1.22. Si se hace uso de la desviación corregida según la Eurochem, el factor usado  $k_Q$  puede ser 5, 6 o 10 (Ec. 1.23) según los criterios de adecuación al uso descritos en la guía, es decir, para  $S_0$  aproximadamente constantes en bajas concentraciones y con RSD de 20, 17 o 10%, respectivamente.

$$LOD = \frac{3 * S_0}{b} \quad (1.21)$$

$$LOQ = \frac{10 * S_b}{b} \quad (1.22)$$

$$LOQ = k_Q * S'_0 \quad (1.23)$$

**Figura 1-5** Árbol de decisión para el cálculo de desviación en LOD y LOQ. Tomado de *Guia Eurochem, cap. 6.22, pp 23, 2010*



### 1.4.6 Estabilidad

Por último, para verificar la validación de un método, es necesario demostrar que los analitos a cuantificar son estables durante todo el análisis, desde su almacenamiento primario hasta la última etapa de tratamiento y medición, incluso tiempo después de que se haya realizado la medición, el analito debe ser estable en el medio. La comparación normalmente se realiza con patrones de concentración conocida que se almacenan durante un tiempo prudencial. Las condiciones son variadas pero su generalización, está documentada en varios trabajos y depende de la naturaleza tanto de los analitos como de las matrices (Anderson, 2010). En general, se evalúa en términos de la señal obtenida para el analito en el día cero y se registra en diferentes intervalos definidos en el plan de validación de acuerdo con las condiciones de almacenaje o necesidades de cada laboratorio. El criterio de aceptación es que no haya cambios significativos de la señal en el tiempo de acuerdo con los niveles de confianza utilizados para los demás parámetros de validación ( $p < 0.05$ ).

## 1.5 Conclusiones

El uso de marcadores inertes en digestibilidad es la mejor manera de evitar la recolecta total de heces y evita errores asociados al muestreo y a la variabilidad durante los periodos de recolecta, principalmente cuando de animales bajo pastoreo se trata. Debido a que en este tipo de ensayos se requiere trabajar con animales cuya variabilidad intrínseca es muy alta, tales como diferencias en tamaños, *performance* de producción, días de lactancia, edad, entre otros, es muy importante minimizar al máximo el error en las metodologías usadas para la determinación de consumo, por lo que se requiere no solo de una técnica apropiada en campo sino de una gran precisión en el trabajo de laboratorio sin que ello signifique incrementar los insumos o la infraestructura. Por ende, el uso de óxido de cromo como marcador ofrece una opción adecuada y representativa en varias especies animales a pesar de que otros marcadores han sido propuestos con este fin, ya que además no tiene el factor limitante de la complejidad analítica que sí tienen otros marcadores. A la hora de elegir, podría pensarse que el óxido de titanio es más ventajoso frente al óxido de cromo debido a que se cree que el primero no presenta un alto riesgo para la salud. Sin embargo, el potencial de toxicidad que tiene el óxido de



cromo al convertirse en cromatos y dicromatos durante el análisis ha sido sobredimensionado a falta de conocimiento de su comportamiento tanto en sistemas biológicos como en el medio ambiente.

Dado que el cromo existe en múltiples formas, la hexavalente (la más estable), es la que mayor importancia tiene en estudios de evaluación de riesgo. El Cr(VI) puede ser reducido a su forma trivalente pero este proceso no ocurre en dirección contraria en los sistemas fisiológicos; es decir, el Cr(III) no puede ser oxidado en el cuerpo. La importancia de la química del cromo en los organismos radica en que se ha demostrado en humanos que la incidencia de tumores y efectos cancerígenos radica principalmente en la vía de exposición, siendo por inhalación la que está relacionada con estos efectos. En las conclusiones a las que ha llegado la EPA a través de exhaustivos estudios a lo largo de las últimas décadas, se entiende que no hay suficiente evidencia de que el Cr(III) tenga algún tipo de efecto cancerígeno en humanos. La principal razón de ello es que el cromo trivalente es pobremente absorbido mientras que el Cr(VI) está disponible por las células a través de transportadores que aún no han sido claramente identificados. El Cr(VI) es tóxico únicamente cuando es absorbido por las células y reducido en el interior de éstas a Cr(III) por inhalación. Cuando se da la ingestión de Cr(VI), este es reducido rápidamente por el medio del tracto gastrointestinal antes de que esta pueda ser absorbido en la célula de manera significativa. Sin embargo, este es un proceso competitivo que depende de la cinética de esta reacción de equilibrio y dada su complejidad, los mecanismos mediante los cuales se da este proceso aún están siendo explorados.

Así, la manipulación del  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en polvo por parte de los investigadores y su posterior uso en animales es prácticamente inocuo; el riesgo asociado a la salud está directamente ligado a la forma hexavalente vía aérea, por lo que su potencial toxicológico debería ser mínimo ya que la única exposición posible a este tipo de compuestos es durante el tratamiento de las muestras. En ese sentido, el potencial toxicológico se limita a la manipulación en el laboratorio de las muestras tratadas y sus residuos, y puesto que esto constituye un riesgo asociado a enfermedad laboral que se da únicamente como resultado a la exposición, los factores de riesgo son inherentes a la actividad de laboratorio, por lo que todos sus sistemas de gestión de seguridad y salud deben

contemplar medidas preventivas que minimicen el riesgo. Por tanto, la toxicidad de este marcador no constituye un elemento tangible de juicio cuando se trata de su elección en ensayos con marcadores.

Aunque en la actualidad, las referencias de evaluación cuantitativa de riesgo químico en laboratorios que trabajan con Cr (VI) son escasas y en su mayoría ligada a la industria (Park et al., 2004), la literatura reporta una cantidad abundante de referencias relacionados con espacios industriales en los que a pesar de que las concentraciones de cromatos y dicromatos presentes en polvos, humos y nieblas son importantes, la incidencia de efectos cancerígenos es mínima cuando el riesgo es controlado a través de los elementos de protección personal de los trabajadores (HSE, 2013; Haney, Erraguntla, Sielken, & Valdez-Flores, 2014; Wang, Hu, & Lu, 2015).

Por otro lado, la facilidad de cuantificación del  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  por técnicas de bajo costo y fácil operatividad como la espectrofotometría Uv-Vis, lo hacen ideal para su aplicación en ciencias animales, por lo que definir cuáles son los parámetros críticos dentro de las metodologías usadas es pertinente y necesario antes de adoptar métodos reportados en la literatura. En la exploración realizada sobre dichos parámetros, se observa que el método más reportado para cuantificación de cromo en heces presenta imprecisiones que han conllevado a deslegitimar su eficacia y robustez, desplazándolo como opción analítica y restándole validez al marcador de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , por lo que se hace necesario reevaluar los parámetros implícitos en el método para lograr una correcta implementación de este y que siga siendo una herramienta al alcance de los investigadores en ciencias pecuarias.

Cuando se ha establecido un método, la validación y el soporte estadístico de su desempeño es fundamental para el aseguramiento de los resultados, por ello la aplicación y el uso de herramientas estadísticas, es necesario para evaluar la capacidad de este y a futuro, contar con suficiente información que permita el desarrollo de modelos de predicción que disminuyan la cantidad de análisis a realizar y se optimicen los recursos en los centros de investigación.

## 1.6 Bibliografía

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2018, May 14). Retrieved from <http://www.atsdr.cdc.gov/>
- Akarachantachote N., Chadcham S., Saithanu K. (2014). Cutoff Threshold Of Variable Importance In Projection For Variable Selection. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*, 94(3), 307–322.
- Anderson, R.A. (2000). Chromium in the prevention and control of diabetes. *Diabetes & Metabolism*, Vol. 26, pp. 22–27.
- Anderson, R. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. *Unodc*, 1, 76. <https://doi.org/ST/NAR/41>
- Artursson, P. (1990), Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.*, 79: 476-482. doi:10.1002/jps.2600790604
- AOAC. (2013). Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. *AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Methods of Analysis*, 1–32.
- ASTDR, C., 2017. List of Priority Hazardous Substances. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, Retrieved May 21, 2018 from <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
- Baetjer, A.M., Lowney, J.F., Steffee, H. (1959). Effects of chromium on incidence of lung tumors in mice and rats, *Archives of Industrial Health*, 20, pp. 124–135
- Balimane, P. V., Chong, S., & Morrison, R. A. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), 301–312. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00113-1)
- Bernard, J. B.; Ullrey, D. E.; Wolff, P. L. (1995). Selecting appropriate markers for digestibility studies. *Proceedings of the Nutrition Advisory Group* 1, 203–206. Google Scholar
- Bielicka, A., Bojanowska, I., Wisniewski, A. (2005). Two faces of chromium pollutant and bioelement. *Pol. J. Environ. Stud.* 14, 5–10.
- Brown, Wendy & Choct, Mingan & Pluske, John. (2005). The use of inert markers for protein digestibility studies in dogs.

- Calder, L.M. (1988). Chromium contamination of groundwater, in Chromium in the Natural and Human Environments, Nriagu, J.O. and Nieboer, E., Eds., John Wiley and Sons, New York, pp. 215–231
- Carr, K.E., Toner, P.G.. (1984). Morphology of the Intestinal Mucosa. Pharmacology of Intestinal Permeation I. pp. 1-50. Doi:10.1007/978-3-642-69505-6\_1.
- Carciofi, A. C., Vasconcellos, R. S., de Oliveira, L. D., Brunetto, M. A., Valério, A. G., Bazolli, R. S., ... Prada, F. (2007). Chromic oxide as a digestibility marker for dogs—A comparison of methods of analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 134(3–4), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.12.005>
- Cefalu, W., & Hu, F. (2013). Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:2741–2751. *Diabetes Care*, 36(9), 2872. <http://doi.org/10.2337/dc13-er09>
- Cohen, M. D., Kargacin, B., Klein, C. B., & Costa, M. (1993). Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(3), 255–281. <https://doi.org/10.3109/10408449309105012>
- Czarnocki. (1960). The determination of chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Can. J. Anim. Sci.*, 167–179.
- Davis, A. and Olsen, R.L. (1995). The geochemistry of chromium migration and remediation in the subsurface, *Ground Water*, vol. 33, pp. 759–768.
- Dean, J.A (2007) *Lange's Handbook Of Chemistry, Materials and Manufacturing Processes*, 10th ed. pp1496-1505, DOI: 10.1080/10426919008953291
- Delagarde, R., Pérez-Ramírez, E., & Peyraud, J. L. (2010). Ytterbium oxide has the same accuracy as chromic oxide for estimating variations of faecal dry matter output in dairy cows fed a total mixed ration at two feeding levels. *Animal Feed Science and Technology*, 161(3–4), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.08.006>
- De Mattia, G., Bravi, M. C., Laurenti, O., De Luca, O., Palmeri, A., Sabatucci, A., Mendico, G., and Ghiselli, A. (2004) Impairment of cell and plasma redox state in subject professionally exposed to chromium. *Am. J. Ind. Med.* 46, 120–125.
- Dianyi Yu, M. D. (2011). Chromium (Cr) Toxicity | ATSDR - CSEM, 1–67, Environmental Medicine and Educational Services Branch, Atlanta, GA, pp. 4-67.
- Dressman, J. B., Amidon, G. L. and Fleisher, D. (1985), Absorption potential: Estimating the fraction absorbed for orally administered compounds. *J. Pharm. Sci.*, 74: 588-589. doi:10.1002/jps.2600740523.
- Eary, L.E. and Rai, D., 1991, Chromate reduction by subsurface soils under acidic conditions, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 55, pp. 676–683.

- Eastmond, D. A., MacGregor, J. T., & Slesinski, R. S. (2008). Trivalent chromium: Assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(3), 173–190. <https://doi.org/10.1080/10408440701845401>
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), 2016. Scientific Opinion on the re-evaluation of titanium dioxide (E 171) as a food additive. *EFSA Journal* 2016;14(9):4545, 83 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4545
- EPA. (1998). Toxicological review of trivalent Chromium CAS No. 16065-83. Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). Retrieved from <http://www.epa.gov/iris>
- EPA. (2010). Toxicological Review of HEXAVALENT CHROMIUM (CAS No. 18540-29-9). Review Literature And Arts Of The Americas, 39(110), 759–786. <https://doi.org/http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0070tr.pdf>
- EPA (2017). Chromium in Drinking Water. Retrieved May 21, 2018, from <https://www.epa.gov/dwstandardsregulations/chromium-drinking-water>
- Finley. L (1996). Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drinking water. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 141, 145.
- Fisher, R. A. (1936). The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of eugenics*, 7(2), 179-188
- Flegal, R., Last, J., McConnell, E., Schenker, M., and Witschi, H., 2001, Scientific review of toxicological and human health issues related to the development of a public health goal for chromium(VI), p. 18. Retrieved May 15, 2018 from <https://www.waterboards.ca.gov/>
- Franz, R., Kreuzer, M., Hummel, Hatt, J., J-M. (2011) Intake, selection, digesta retention, digestion and gut fill of two coprophageous species, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*), on a hay-only diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95(5), 564–570. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01084.x>
- Guertin, J. (Ed.), Jacobs, J. (Ed.), Avakian, C. (Ed.), Hart, J., Middleton Williams, S., Suthersan, S., Auckly, C., Willett, A., Deeb, R., Kavanaugh, M., Steinpress, M., Hawley, E., Motzer, W., McGrath, A., Bohan, D., Horst, J., Hellerich, L., Dobbs, G., Hyatt, A., Brown, S., Latutz, N., Zuckerman, T., Stanin, F., Howard, Jr., R., Solange Pollard, M., Szecsody, J., Henrie, T., Criddle, C., Simion, V., Weber, J., Fruchter, J., Vermeul, V., Williams, M., Devary, B., Oberle, D., Schroder, D., McInnes, J., Maxwell, C., Dybas, M., Wierzbicki, D., Peery, J., Koenigsberg, S., Panciera, M., Smets, B., Simon, M., Kemp, P., Begley, J., Gavend, G., Brun, M., Velez, M., Goonan, T., Van den Bossche, V., Aitio, A., Murphy, R., Papp, J., Olson, W., Pollard, M., Testa, S., Rouse, J., Ramachandran, G., Abbott, D., Solar, S., Nikolaidis, N. (2004). *Chromium(VI) Handbook*. Boca Raton: CRC Press.

- Haney, J. T., Erraguntla, N., Sielken, R. L., & Valdez-Flores, C. (2014). Development of an inhalation unit risk factor for hexavalent chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(2), 201–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.12.005>
- Hilburger, E. J., H. C. Wilson, H. C. Freetly, and R. M. Lewis. 2017. Assessing plant-waxes markers as a tool to estimated intake and diet composition in beef cattle. Master Thesis University of Nebraska, Lincoln.
- Health and Safety Executive, 2013. Chromium and you. Working with chromium – are you at risk?. Vol: INDG346 (rev1) pp: 1-4 Retrieved May 21, 2018, from <http://www.hse.gov.uk/pubns/indg346.htm>
- Icontec. (2005). Norma Técnica Colombiana NTC-ISO / IEC 17025. In *Norma Técnica Colombiana* (p. 49).
- Jacobs, B. M., Patience, J. F., Lindemann, M. D., Stalder, K. J., & Kerr, B. J. (2017). Disappearance and appearance of an indigestible marker in feces from growing pigs as affected by previous- and current-diet composition. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 32. [doi.org/10.1186/s40104-017-0161-9](https://doi.org/10.1186/s40104-017-0161-9)
- Jardine, P.M., Stewart, M.A., Barnett, M.O., Basta, N.T., Brooks, S.C., Fendorf, S., Mehlhorn, T.L., 2013. Influence of soil geochemical and physical properties on chromium(VI) sorption and bioaccessibility. *Environ. Sci. Technol.* 47, 11241–11248.
- Kim, K.R., Owens, G., Naidu, R. (2010). Effect of root-induced chemical changes on dynamics and plant uptake of heavy metals in rhizosphere soils. *Pedosphere* 20, 494–504
- Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L., and Mabuni, C., 1999, A critical assessment of chromium in the environment, in *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* vol. 29, pp. 1–46.
- Kimura, F. T., & Miller, V. L. (1957). Chromic Oxide Measurement, Improved Determination of Chromic Oxide in Cow Feed and Feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(3), 216. <https://doi.org/10.1021/jf60073a008>
- Kotas, J. and Stasicka, Z., 2000, Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation, *Environ. Poll.*, vol. 107, pp. 263–283.
- Kumar, R., Mishra, R. K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S. K., ... Dikshit, A. (2016). Chapter 13 - Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. In P. Ahmad (Ed.), *Plant Metal Interaction* (pp. 335–359). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>
- Hassoun, P., Bastianelli, D., Autran, P., & Bocquier, F. (2014). Polyethylene glycol compared with ytterbium oxide as a total faecal output marker to predict organic

- matter intake of dairy ewes fed indoors or at pasture. *Animal*, 8(9), 1420-1426. doi:10.1017/S1751731114001451
- Lachmann, Mariela & Araujo-Febres, Omar. (2000). La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes. Retrieved January 20 2018 from <http://avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/Digestibilidadderumiantes.pdf>
- Latimer, G. W., & AOAC International. (2012). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Appendix F, pages 1-17. Retrieved from [www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)
- Lindberg, J. (1985). Retention time of chromium-labelled feed particles and of water in the gut of sheep given hay and concentrate at maintenance. *British Journal of Nutrition*, 53(3), 559-567. doi:10.1079/BJN19850065
- Lindemann, M. (2002). Evaluation of bioavailability of chromium from various organic sources. *Proceedings of the 17th IPVS Congress* 2:460
- Loehlein, W., Kienzle, E., Wiesner, H., & Clauss, M. (2003). Investigations on the use of chromium oxide as an inert external marker in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). Passage and recovery rates, 2.
- Lui, C. Y., Amidon, G. L., Berardi, R. R., Fleisher, D., Youngberg, C. and Dressman, J. B. (1986), Comparison of gastrointestinal pH in dogs and humans: Implications on the use of the beagle dog as a model for oral absorption in humans. *J. Pharm. Sci.*, 75: 271-274. doi:10.1002/jps.2600750313
- Lukina, Anna & Boutin, C & Rowland, Owen & Carpenter, David. (2016). Evaluating trivalent chromium toxicity on wild terrestrial and wetland plants. *Chemosphere*. 162. 355-364. 10.1016/j.chemosphere.2016.07.055. World Health Organization. (2014). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, (April 2014), pp 41.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- Marbaniang, D., Chaturvedi, S.S. (2014). Assessment of Cr+6 accumulation and phytoremediation potential of three aquatic macrophytes of Meghalaya, India. *Int. J. Sci. Res.* 3, 36–42.
- Morgan, N., Scholey, D., & Burton, E. (2014). A comparison of two methods for determining titanium dioxide marker content in broiler digestibility studies. *Animal*, 8(4), 529-533. doi:10.1017/S1751731114000068
- Motzer W.E (2005). Chemistry, Geochemistry, and Geology of Chromium and Chromium Compounds in Chromium (VI) handbook (J. Guertin, J. A. Jacobs, & C. P. Avakian, Authors). Boca Raton, FL: CRC Press, cap 2, pp 24-84

- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), 2007, Online Pocket Guide to Chemical Hazards, NIOSH, Retrieved May 21, 2018 from <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2005-149/pdfs/2005-149.pdf>
- Njaa L. R. (2009) Determination of Protein Digestibility with Titanium Dioxide as Indicator Substance, *Acta Agriculturae Scandinavica*, 11:3-4, 227-241, DOI: 10.1080/00015126109434994
- Pal, S., Kundu, R. (2014). Study of metal resistance potential of the Cd, Cr tolerant alligator weed. *J. Stress Physiol. Biochem.* 10, 244–261
- Palmer, C.D. and Puls, R.W. (1994) Natural attenuation of hexavalent chromium in groundwater and soils: ground water issue, Environmental Protection Agency, EPA/540/S-94/505, 13
- Park, R., Bena, J., Stayner, L., Smith, R., Gibb, H., & Lees, P. S. (2004). Hexavalent Chromium and Lung Cancer in the Chromate Industry: A Quantitative Risk Assessment. *Risk Analysis*, 24(5), 1099–1108. <https://doi.org/10.1111/j.0272-4332.2004.00512.x>
- Ponnuvel P (2016). Role of Tracer techniques in Animal Nutrition- A review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences (IJARBS)*. pp. 165-173. Doi: 10.22192/ijarbs.2016.03.11.020.
- Pope, M. T., & Müller, A. (1991). Polyoxolometalate chemistry - An old field with new dimensions in several disciplines. *Angewandte Chemie International Edition*, 30(1), 34–48. <https://doi.org/10.1002/anie.199100341>
- Prado, F. E., Hilal, M., Chocobar-Ponce, S., Pagano, E., Rosa, M., & Prado, C. (2016). Chapter 6 - Chromium and the Plant: A Dangerous Affair? In P. Ahmad (Ed.), *Plant Metal Interaction* (pp. 149–177). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00006-0>
- Rai, D., Sass, B.M., and Moore, D.A., 1987, Chromium(III) hydrolysis constants and solubility of chromium(III) hydroxide, *Inorganic Chemistry*, 26, 345–349.
- Reddy, L.C.S., Reddy, K.V.R., Humane, S.K., Damodaram, B. (2012). Accumulation of chromium in certain plant species growing on mine dump from Byrapur, Karnataka, India. *Res. J. Chem. Sci.* 2, pp. 17–20
- Reichenbacher Mandred, E. J. W. (2011). *Challenges in Analytical Quality Assurance*. Jena, Germany: Springer.
- Ribeiro Filho, H.M.N., Zimmermann, F.C., Kozloski, G.V. Baixa dosagem de óxido de cromo para estimativa da produção fecal em bovinos. *Cienc. Rural*. 2008;38:2567–2573



- Richard, F.C. and Bourg, A.C.M., 1991, Aqueous geochemistry of chromium: a review, *Wat. Res.*, vol. 25, pp. 807–816.
- Rocha, G. C., Palma, M. N. N., Detmann, E., & Filho, S. de C. V. (2015). Evaluation of acid digestion techniques to estimate chromium contents in cattle feces. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50(1), 92–95. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100010>
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Valente, T. N. P., Souza, M. A., Filho, S. C. V, & Paulino, M. F. (2011). Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle 1 Recuperação fecal e vício de tempo longo de indicadores internos e externos em ensaio de digestão com bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 174–182. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300026>
- Sandoval, S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*, 66. Retrieved from [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia T?cnica 1 validaci?n de M?todos y determinaci?n de la incertidumbre de la medici?n\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Tecnica_1_validaci%20n_de_M%20todos_y_determinaci%20n_de_la_incertidumbre_de_la_medici%20n_1.pdf)
- Scanes, C. G., & Hill, R. A. (2018). *Biology of domestic animals*. Boca Raton; London ; New York: CRC Press.
- Shadreck, M., Mugadza, T. (2013). Chromium, an essential nutrient and pollutant: a review. *Afr. J. Pure Appl. Chem.* 7, 310–317.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ.Int.* 31, 739–753
- Short, F. J., Gorton, P., Wiseman, J., & Boorman, K. N. (1996). Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. *Animal Feed Science and Technology*, 59(4), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00916-7](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00916-7)
- Sinex, S. A., Cantillo, A. Y., & Helz, G. R. (1980). Accuracy of Acid Extraction Methods for Trace Metals in Sediments. *Analytical Chemistry*, 52(14), 2342–2346. <https://doi.org/10.1021/ac50064a023>
- Singh, H.P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D.R., Kohli, R.K. (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environ. Chem. Lett.* 11, 229–254
- Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol.* 2011 Dec;45(4):227-47. doi: 10.2478/v10019-011-0037-0. Epub 2011 Nov 16
- Soergel, K. H. (1968). Inert Markers. *Gastroenterology*, 54(3), 449–452. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(68\)80107-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(68)80107-6)

- Sprinkle, J. E., Kress, D. D., Doornbos, D. E., Anderson, D. C., & Tess, M. W. (1995). Chromic oxide contamination ly used in marker studies of pasture previous-, 48(May), 194–197.
- Srivastava, V. (2014). Effect of chromium on growth, morphology and economic yield of *Helianthus annuus* L. varieties. *Adv. Biores.* 5, 42–47
- Svecevicus, G. Use of behavioral responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in identifying sublethal exposure to hexavalent chromium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.82, p.564-568, 2009
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
- Titgemeyer, E. C. (1997). Design and Interpretation of Nutrient Digestion Studies. *Journal of Animal Science*, 75(8), 2235–2247. <https://doi.org/10.2527/1997.7582235x>
- Titgemeyer, E. C., Armendariz, C. K., Bindel, D. J., Greenwood, R. H., & Löest, C. A. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of*
- Tzeng, D. Y., & Berns, R. S. (2005). A review of principal component analysis and its applications to color technology. *Color Research and Application*, 30(2), 84–98. <https://doi.org/10.1002/col.20086> *Animal Science*, 79(4), 1059–1063. <https://doi.org/2001.7941059x>
- University of Nottingham, Royal Derby Hospital Centre MRC-ARUK Centre for Musculoskeletal Ageing Research, Clinical, Metabolic and Molecular Physiology Derby United Kingdom
- US EPA. (2018). Hexavalent Chromium Workshop | US EPA. [online] Available at: <https://www.epa.gov/iris/hexavalent-chromium-workshop> [Accessed 19 May 2018].
- Wang, Y., Hu, L., & Lu, G. (2015). Health Risk Assessments Based on Existing Data of Arsenic, Chromium, Lead, and Zinc in China's Air. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 21(2), 560–573. <https://doi.org/10.1080/10807039.2014.934602>
- Wilkinson, D. J. (2018), Historical and contemporary stable isotope tracer approaches to studying mammalian protein metabolism. *Mass Spec Rev*, 37: 57-80. doi:10.1002/mas.21507
- Willmann, S., Edginton, A.N., Dressman. (2007). Development and Validation of a Physiology-based Model for the Prediction of Oral Absorption in Monkeys. *J.B. Pharm Res* 24: 1275. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9247-y>
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P.(1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1), 37–52. doi:10.1016/0169-7439(87)80084-9



## 2. Optimización del método colorimétrico

### 2.1 Resumen

El objetivo de este trabajo es evaluar los factores que inciden en la sensibilidad del método colorimétrico de Fenton y optimizar las condiciones de análisis para la cuantificación de cromo en heces y alimentos provenientes de ensayos de digestibilidad en los que se utiliza  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  como marcador externo. Encontradas las condiciones óptimas, se propone un protocolo detallado para su posterior validación analítica. Para ello, se realizaron ensayos de diferentes condiciones de digestión, posteriormente se evaluó el efecto de la matriz bajo estos parámetros y se realizó un análisis multivariado para seleccionar la  $\lambda$  de mejor respuesta predictiva en el rango Uv-Vis. En el primer ensayo, se tomaron estándares de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , los cuales fueron sometidos a digestión ácida a tres temperaturas, 250, 280 y 300°C durante 15 minutos. El ensayo se repitió posteriormente dejando la digestión 30 minutos. Para todas las soluciones obtenidas, se toman los espectros de absorbancia entre 200 y 700 nm. El análisis espectral indicó que la digestión que presenta mejor sensibilidad en todas las  $\lambda$  de referencia es a 250°C durante 30 minutos. Para el segundo ensayo, se evaluó el efecto de la matriz mediante la técnica de adición de estándar. Las curvas de calibración se realizaron utilizando estándar de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  sometido al método original y a las condiciones previamente definidas para la digestión utilizando como blanco la mezcla digestora. El proceso se repitió enriqueciendo con  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  heces de animales no dosificados con el marcador y se fabricó una curva de calibración en los mismos niveles de la curva de referencia. Se realizó una prueba de contraste para pendientes y se encontró que no hay diferencia significativa entre ellas ( $p > 0.05$ ) bajo ninguna de los métodos ensayados, por lo que no hay efecto de la matriz sobre la absorción. Para la elección de la  $\lambda$  de trabajo, se utilizó un análisis multivariado sobre componentes principales usando como criterio de selección proyecciones de variables de importancia (*VIP*) y utilizando los parámetros de un modelo de regresión parcial en mínimos cuadrados (*PLS*) realizado sobre 50 espectros de

absorción correspondientes a muestras de heces y alimentos con contenido de Cr y estándares de referencia. Se siguió una metodología de filtro y se realizó una validación cruzada del modelo de predicción, encontrando un  $CV = 0.011\%$ , un  $RSME = 0.579$  y un ajuste de correlación  $R^2$  de 0.998. Con los parámetros del modelo, se calcularon las variables de importancia  $VIP$  ( $\lambda$ ) para la predicción de concentración de Cr. De acuerdo con los puntajes obtenidos, se estableció que las  $\lambda$  adecuadas para la el análisis de Cr mediante el método colorimétrico son 361, 362 y 363 nm, por encima de las  $\lambda$  de referencia tradicionales ( $\lambda=430$  y 440nm). Con todas las condiciones optimizadas y definida la longitud de onda para la medición, se propone un protocolo detallado para la cuantificación colorimétrica de Cr en heces y alimentos.

## 2.2 Introducción

El método colorimétrico establecido por Fenton y Fenton en 1979 para cuantificación de cromo en heces de rumiantes, ha sido ampliamente usado desde su publicación en la determinación de producción fecal total para estimación de digestibilidad en diferentes especies animales. Sin embargo, éste ha sido cuestionado por presentar baja sensibilidad cuando se compara con métodos como FASS (Cabral et al., 2017). El método consiste en la digestión con una mezcla de ácido perclórico, sulfúrico y agua, de muestras de heces con contenido del marcador inerte proveniente de ensayos de digestibilidad, las cuales son previamente incineradas a 450°C durante la noche y llevadas a plancha de calentamiento hasta 300°C o hasta el desarrollo de color amarillo o rojizo para posteriormente ser llevadas un volumen final de 200mL con agua destilada. Las soluciones resultantes, una vez centrifugadas, son analizadas por espectrofotometría a 440 nm. Cuando se aplica el método en muestras de ensayo con concentración conocida de Cr, se encuentra que las concentraciones halladas están muy alejadas de los valores reales y que, durante la aplicación del protocolo, existen variaciones en el desarrollo del color que hacen inferir que las condiciones no son las adecuadas para la cuantificación. Es necesario entonces reevaluar cada uno de los pasos dentro del procedimiento para detectar cuáles son sus falencias e implementar mejoras que permitan contar con un método estandarizado para la cuantificación de Cr en heces.

La cuantificación de Cr a través de métodos espectrofotométricos en muestras con contenido de materia orgánica, en general, tiene tres componentes críticos: la incineración, la digestión y el instrumento para las lecturas (Gilchrist & Nobbs, 1999, Thomson 2017). La importancia de realizar una incineración adecuada previa a la digestión, está relacionada con la alta temperatura y la reactividad del cloro libre formado en la solución final, por lo tanto, las cenizas son el mejor medio para extraer metales refractarios, como el cromo (Hseu, 2004). La temperatura de oxidación de la materia orgánica (MO) ha sido ampliamente estudiada y establecer el punto requerido depende del analito que se quiera recuperar en las cenizas, siendo un común denominador para metales temperaturas entre 550 y 800 °C (Salonen, 1979; Verbinnen, Billen, Van Coninckxloo, & Vandecasteele, 2013). Para el Cr, se ha establecido la escala de oxidación de acuerdo con la temperatura de combustión, la cual se completa a 700 °C en atmósfera de oxígeno, punto en el cual la MO desaparece por completo, siendo éste el punto ideal para la incineración ya que, además, se evita la pérdida de Cr por volátiles (Falk-Windisch et al., 2015; Schmid 2001).

Se ha encontrado también que los procedimientos con ácido sulfúrico y perclórico recuperan la mayor cantidad de Cr en la mayoría de muestras orgánicas ( Rodushkin et al. 1999; Rocha, Palma, Detmann, & Filho, 2015), mientras que otros con ácido nítrico y ácido nítrico-perclórico no difirieron significativamente en términos de recuperación de Cr en heces y guanos (Hseu, 2004b). La temperatura de la digestión debe ser tal que se dé la oxidación completa del  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y se asegure la proporción ácida en solución para favorecer la formación del ion amarillo  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  y evitar la polimerización aniónica que se caracteriza por el color rojizo (Shupack, 1991). En el caso de la cuantificación de Cr con el método colorimétrico, existe un factor adicional y es la formación de color mediada por molibdato de sodio. En este sentido, se ha reportado que el papel del Mo en la digestión es de catalizador (Kimura & Miller, 1957), sin embargo, estudios de reactividad de policristales con metales de transición, indican que en presencia de Mo se da la formación de polioxianiones coloreados con el ión  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , de manera que las condiciones de temperatura durante la digestión deben ser controladas para la estabilización del complejo metálico, la permanencia del color y el aumento de la resistividad del medio ácido (Ansari, Singh, & Yadava, 1990; Pope & Müller, 1991).

Por otro lado, las lecturas espectrofotométricas para este método generalmente se realizan suponiendo que la especie formada es el ión  $Cr_2O_7^{2-}$  y se usa la  $\lambda$  de referencia de máxima absorción en el visible para el dicromato, a 440 nm. Se encuentran trabajos en donde se reporta mejor sensibilidad entre 350 y 360 nm y diferencias en las bandas espectrales debidas al pretratamiento de muestras (Czarnocki, 1960), mientras que estudios más recientes demuestran otras bandas importantes debida a la especiación del Cr, atribuyéndolas a la cinética de conversión, condiciones de oxidación y composición de la matriz o de los ácidos presentes (Szabó et al., 2018). Los estándares de precisión fotométrica de  $K_2Cr_2O_7$ , en general, se consiguen para lecturas en 235, 257, 313, 350, 440, 465, 546, 590 y 635 nm (Starna, 2017). De estas, entre 430 y 445 nm han sido usadas para la cuantificación de  $Cr_2O_3$  a pesar de que existen importantes diferencias espectrales debidas a la especiación del Cr (Kasper, 1935; Szabó et al., 2018b). De estas  $\lambda$ , ninguna es específica para la cuantificación de la especie coloreada en la reacción con Mo (IV) propuesta en el método previamente señalado.

Con el fin de obtener un método con mejor sensibilidad, en este capítulo se analizan las diferentes condiciones de los parámetros críticos en la preparación de las soluciones de medición a través del estudio espectral y la posterior elección de la  $\lambda$  óptima de lectura a través del método de proyección de variables de importancia (VIP) basado en regresiones parciales de mínimos cuadrados (PLS). Con esto, se propone un protocolo de análisis con el fin de tener un método estandarizado para la determinación de Cr proveniente de heces y alimentos usados en la estimación de consumo de forraje bajo pastoreo en rumiantes.

## 2.3 Materiales y métodos

### 2.3.1 Materiales

Se utilizó óxido de cromo III ( $Cr_2O_3$ , Merck, 99%) para la preparación de soluciones estándar de laboratorio. La mezcla digestora se preparó con  $H_2SO_4$  al 70% (Merk),  $HClO_4$  al 70% (Panreac), agua destilada y adición de 20 g/L de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (Sigma Aldrich, 99%) de pureza marca de acuerdo con el método de Fenton y Fenton. Las mediciones de absorción se realizaron con un espectrofotómetro UV-line 900 Schott y celdas de

cuarzo. Como matriz libre de analito ( $H_0$ ), se utilizaron heces tomadas *in situ* de tres vacas Holstein multíparas no dosificadas con el marcador. Las muestras de ensayo ( $H_{Cr}$ ) fueron tomadas de vacas Holstein multíparas dosificadas con pellets de 10 g  $Cr_2O_3$ /día durante dos periodos de 30 días y suplementadas con concentrado comercial. Todos los animales se encontraban pastando *kikuyo* entre 32 y 43 días de rebrote en la Estación Agraria “Paysandú”, de la Universidad Nacional, Medellín, ubicada a 2600 msnm, con una temperatura media de 14 °C, precipitación media de 2500 mm y humedad relativa promedio de 80%, en una formación ecológica bh-MB según la clasificación de Holdrige.

### 2.3.2 Ensayos de optimización

Se realizaron experimentos con cambios de condiciones de temperatura, tiempo de digestión y efecto matriz. Para los ensayos de temperatura, se tomaron estándares de 0.03 g de  $Cr_2O_3$  y se llevaron a tubos de digestión tipo Kjelhdal con 15 mL de la mezcla digestora en una plancha de calentamiento con control de temperatura. Se realizó la digestión de cada estándar a 250, 280 y 300°C, cada uno por triplicado. Las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente, se transfirieron a balones de 200 mL y se aforaron con agua destilada. Luego fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 4 minutos y con el sobrenadante se prepararon soluciones de trabajo de 30 mg Cr/kg. Se realizó toma de espectros de absorción desde 220 a 700 nm con resolución de 1 nm utilizando celdas de cuarzo. Se realizó análisis cualitativo espectral y comparación de la señal obtenida en las diferentes longitudes de onda reportadas como referencia y a las que se observaron los máximos de absorbancia. Todos los espectros se tomaron usando como blanco la solución digestora sometida al mismo proceso.

Para los ensayos de efecto matriz, se realizaron dos experimentos. Inicialmente se prepararon de manera individual muestras de heces basales ( $H_0$ ) enriquecidas con 2, 6, 12, 15 y 24 mg Cr/kgMS y se trataron según la metodología de Fenton. De igual manera se tomaron 0.03 g  $Cr_2O_3$  en crisol de porcelana y se sometieron al mismo procedimiento como estándar para la preparación de la curva de calibración. A partir de esta última, se preparó la solución stock de la cual se realizaron diluciones sucesivas para la construcción de la curva estándar. Para el segundo experimento, se repitió el



procedimiento, pero se fijó la temperatura de incineración en 700 °C durante 12 h y la digestión ácida a 250°C. Se estableció como criterio de aceptación que hay efecto matriz si la pendiente de la curva de calibración varía significativamente respecto a la pendiente de la curva realizada como adición de estándar en la matriz de  $H_0$  (Meseguer Lloret, 2017).

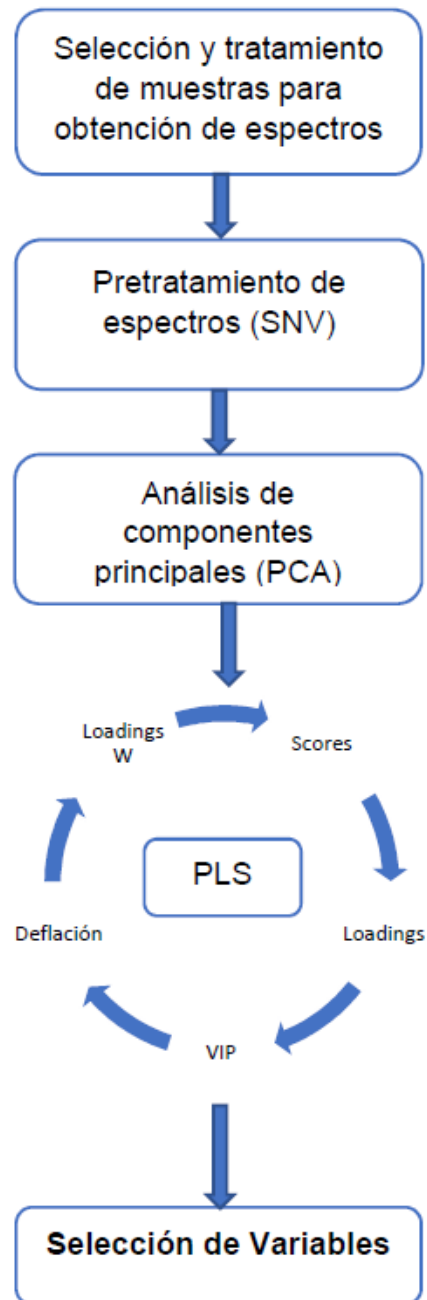
### 2.3.3 Selección de la longitud de onda

El set de datos usados en este trabajo consistió en 50 espectros de absorción Uv-Vis de muestras de estándares, suplementos bovinos y heces con contenido de  $Cr_2O_3$  con concentración de Cr ( $Y$ ) determinada mediante el método de referencia y tomados con resolución de 1nm. La matriz de espectros ( $X$ ) es sometida a corrección de línea base mediante una transformación de variable normal estándar (*SNV*). Se realizó una primera reducción de la dimensionalidad partiendo de las longitudes de onda donde no se presenta absorción por parte del blanco ( $\lambda > 350$  nm) y sobre este rango se realizó la selección de variables por regresión de mínimos parciales cuadrados (*PLS*) siguiendo una metodología de filtro (Mehmood et al, 2012). Se realizó una validación cruzada del modelo. El estimador usado para la validación fue el menor valor de la raíz cuadrada del error de predicción (*RSMP*) y coeficiente de correlación múltiple  $R^2 > 0.99$  calculado como:

$$R^2 = \left( \frac{\sigma_{y\hat{y}}}{\sigma_y \sigma_{\hat{y}}} \right)^2 \quad (2.2)$$

donde  $\sigma_y$  corresponde a la desviación estándar de los valores de referencia,  $\sigma_{\hat{y}}$  la de los valores predichos y  $\sigma_{y\hat{y}}$  la covarianza entre ellos. Posteriormente se calcularon las *VIP* teniendo como criterio valores  $VIP > 1$  para la selección de la  $\lambda$  óptima de trabajo (Gallego G., 2009; Wold, Sjöström, & Eriksson, 2001).

Todos los cálculos fueron realizados con el software *RStudio* usando los paquetes '*Prospectr*' y '*plsVarSel*' (Mehmood et al., 2012b, Steven & López, 2013). El esquema del trabajo computacional se visualiza en la Figura 2-1.

**Figura 2-1** Metodología para la selección de variables por PLS-VIP

## 2.4 Resultados y discusión

### 2.4.1 Efecto de los parámetros de digestión

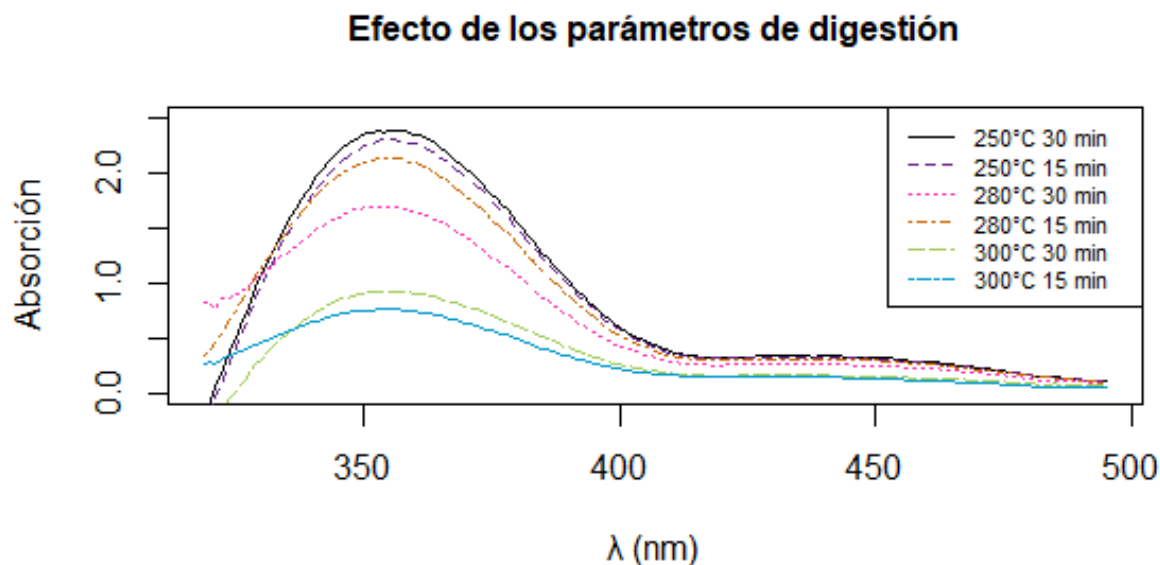
Debido a que durante la digestión llevada a cabo entre 10 y 15 minutos para desarrollo de color y hasta 300 °C (Fenton & Fenton, 1979) se encuentra gran variabilidad en el color de la solución final, se hace necesario evaluar diferentes temperaturas con el fin de determinar la óptima para la aplicación del método colorimétrico. En el análisis comparativo, se toman como referencia las  $\lambda$  de mayor absorción encontrada en los espectros y las  $\lambda$  de referencia publicadas en trabajos anteriores basados en los  $\lambda_{\text{max}}$  del ion dicromato (Czarnocki, 1960; Souza et al., 2013; Szabó et al., 2018; Vega, Cubillos, & Ruiz, 2016). Al realizar un primer análisis espectral, se observa que la variación de la temperatura de digestión incide en la intensidad del color desarrollo y que además el tiempo es un factor importante (Figura 2-2). Con el calentamiento a 250 °C durante 15 minutos, se da el desarrollo de color amarillo, que se intensifica en los siguientes 15 minutos. Este cambio entre 15 y 30 minutos no es perceptible de manera visual, sin embargo, la variación en la señal es de aproximadamente un 5% en todas las  $\lambda$  de referencia (Tabla 2-1). Cuando la temperatura sigue subiendo y hasta 280 °C, el color amarillo se mantiene los primeros minutos hasta que empieza a perderse y la solución se torna marrón, disminuyendo notablemente la intensidad en la absorción. A 300 °C, la proporción de volumen no se mantiene y la solución pierde el color deseado.

A temperaturas inferiores a 250 °C, las soluciones viran a rojo y no se da el desarrollo efectivo del color esperado. En todos los casos, se observa la tendencia negativa en la intensidad con el aumento de la temperatura. Cuando se evalúa la intensidad de la señal respecto al tiempo de digestión, se encuentra que para 250 °C se obtiene mejor intensidad de señal con 30 minutos de digestión, mientras que a 280°C la intensidad disminuye con el tiempo.

Estos resultados son coherentes con lo evaluado por otros autores para el estudio de Cr en medios ácidos (Şahan et al., 2014; Shupack, 1991), en donde se concluye que las iones  $HCrO_4^-$  y  $Cr_2O_7^{2-}$ , son responsables de la coloración amarilla y que su estabilidad en el medio depende de las condiciones redox del medio. Así pues, la pérdida de color

después de 250°C, puede atribuirse a la polimerización de tri y tetra aniones cuya principal característica en solución es la coloración marrón-rojiza, lo que incide directamente en la cuantificación de la especie deseada. Cambios de composición de la mezcla digestora debidos a la temperatura, inciden en la cuantificación de la especie deseada y su coexistencia en el medio puede ser la responsable no solo de los cambios observados en las bandas de absorción del complejo formado respecto al de referencia -  $K_2Cr_2O_7$ - (Starna, 2017). Por otro lado, la baja sensibilidad previamente reportada para el método Fenton Souza et al., 2013), puede estar ligada al parámetro de temperatura ya que la descripción del método original no especifica el límite exacto de temperatura ni el tiempo de digestión. Adicionalmente, los resultados fueron consistentes con lo encontrado en análisis similares realizados por otra técnica de colorimetría DPC, en el que se recrearon condiciones similares para la evaluación de las especies de cromo (Divakaran, Obaldo, & Forster, 2002).

**Figura 2-2** Efecto de los parámetros de la digestión



Otro factor considerable es la presencia del  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  que se usa para el desarrollo del color. Aunque se referencia a este compuesto como catalizador, el estudio espectral muestra que los máximos para el  $K_2Cr_2O_7$  sin presencia de Mo difieren de los espectros de estándares con adición de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ . Dado que el Mo ha sido reconocido por

formar polioxoaniones con metales debido su disponibilidad de orbitales d vacíos, dando lugar a la formación de complejos con otros aniones, incluidas las formas hexavalentes de cromo (Borras-Almenar et al., 2003), podría esperarse que éste actúe en la formación de polioxianiones con el ion  $Cr_2O_7^{2-}$  y no simplemente como catalizador, lo que explicaría las diferencias espectrales entre los estándares usados normalmente como referencia y lo encontrado en este estudio. Desafortunadamente, la relación entre Cr y Mo bajo las condiciones del método de Fenton ha sido poco estudiadas desde el ámbito estructural y de formación de polioxianiones, por lo que la caracterización de la especie está aún sin definir con certeza.

**Tabla 2-1** Valores de absorción

Parámetros de digestión		$\lambda$ (nm)					
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	362	363	364	430	440	465
15	250	2.233	2.211	2.180	0.332	0.335	0.259
	280	2.061	2.044	2.012	0.316	0.322	0.249
	300	0.739	0.732	0.722	0.162	0.153	0.113
30	250	2.333	2.314	2.281	0.343	0.344	0.269
	280	1.629	1.613	1.590	0.276	0.272	0.215
	300	0.904	0.897	0.884	0.172	0.171	0.136

### 2.4.2 Efecto matriz

Con el fin de identificar posibles distorsiones en la señal debidas a la presencia de ceniza remanente de la incineración de la muestra, se evalúa el efecto de la matriz ( $H_0$ ) mediante el método de adición de estándar. La evaluación de la homogeneidad de las varianzas para las dos rectas de calibrado en el primer experimento se realiza con una prueba F de dos colas en un nivel de confianza del 95% y  $n-2$  grados de libertad ( $F_{crit\ 95\%,3,3}=15.44$ ). Se establece que las varianzas son homogéneas si  $F_{crit\ 95\%,3,3} > F_{calc}$ .

El valor encontrado para  $F$  ( $F_{calc}=13.5$ ) es menor al crítico (Ec.2.2); por ende, las varianzas son homogéneas y se procede con un ensayo  $t$  de significancia para esta condición en el mismo nivel de confianza con  $n_1+n_2-2$  grados de libertad ( $t_{crit}=2.31$ )

$$F_{calc} = \frac{S_{b1}^2}{S_{b2}^2} \quad (2.2)$$

$$t_{calc} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b1}^2 + S_{b2}^2}} \quad (2.3)$$

Se halla que el valor de  $t_{calc}$  es 0.34, por lo que se concluye que las pendientes no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ ).

La misma evaluación se aplica para las curvas de calibración y adición del estándar sobre la matriz  $H_0$ , que se realizaron en el segundo experimento con una temperatura de digestión de 250 °C. En este caso, el  $F_{calc}=1.43$ , encontrando que es menor al  $F_{crit\ 95\%,3,3}$ , por lo que se aplica nuevamente una prueba  $t$  para pendientes con varianzas homogéneas en el mismo nivel de confianza con  $n_1+n_2-2$  grados de libertad, hallando  $t_{calc}=0.93$ . Nuevamente se concluye que las pendientes no difieren estadísticamente ( $p>0.05$ ). Los estadísticos de las regresiones se relacionan en la Tabla 2-2 y los parámetros de las curvas en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-2** Resumen Estadísticos de las curvas de regresión

<i>Estadísticas de la regresión</i>	<i>Digestión hasta 300°C</i>		<i>Digestión a 250°C</i>	
	<i>Calibración externa</i>	<i>Adición de estándar</i>	<i>Calibración externa</i>	<i>Adición de estándar</i>
$r$	0.99997	0.99965	0.99946	0.99926
$R^2$	0.99995	0.99930	0.99891	0.99853
$R^2$ ajustado	0.99993	0.99907	0.99855	0.99804
Error típico	0.00126	0.00462	0.00884	0.01057

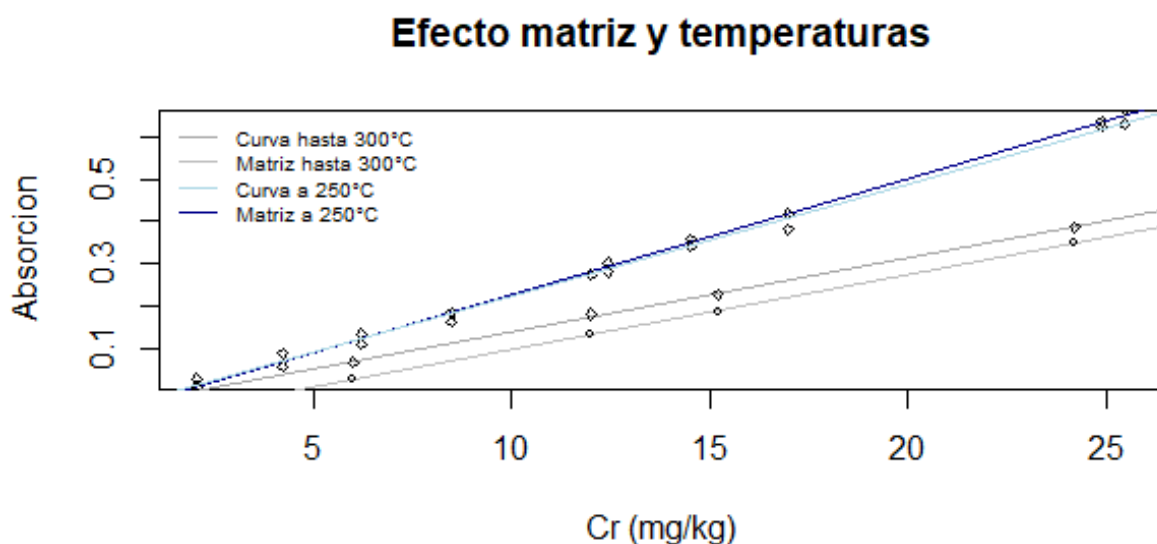
**Tabla 2-3** Parámetros de las curvas de calibración estándar y adición de estándar sobre la matriz de trabajo

T (°C)	Curva		Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	CI inf. 95%	CI sup. 95%
Hasta 300°C	Calibración externa	Intercepto	-0.0803	0.0010367	-77.4	4.75E-06	-0.0836	-0.0770
		Pendiente	<b>0.0177</b>	7.3282E-05	241.7	1.56E-07	0.0175	0.0179

250°C	<b>Adición de estándar</b>	Intercepto	-0.0374	0.0038088	-9.8	0.002242321	-0.0495	-0.0253
		Pendiente	<b>0.0176</b>	0.0002692	65.4	7.86848E-06	0.0168	0.0185
	<b>Calibración externa</b>	Intercepto	-0.0307	0.0072604	-4.2	0.024139274	-0.0538	-0.0076
		Pendiente	<b>0.0266</b>	0.0005066	52.5	1.52233E-05	0.0250	0.0282
	<b>Adición de estándar</b>	Intercepto	-0.0518	0.0086810	-6.0	0.009412834	-0.0794	-0.0242
		Pendiente	<b>0.0273</b>	0.0006057	45.1	2.3979E-05	0.0254	0.0293

Se comprueba así, que la matriz no presenta efectos significativos en el método original ni con la modificación de temperatura de digestión de 250°C. Sin embargo, cuando se contrastan las curvas de calibración para los dos métodos (Figura 2-3), se observa que las pendientes difieren, siendo significativamente mayor para el segundo caso y que, por ende, para la digestión a 250 °C la sensibilidad aumenta considerablemente, siendo mejor la recuperación del analito cuando se controla la temperatura.

**Figura 2-3** Efecto matriz y temperaturas de digestión



Uno de los factores que pudo contribuir a la mejora de la sensibilidad, es que, para el segundo experimento, la temperatura de incineración de las muestras se estableció en 750°C, por ser éste el punto ideal para llevar a cabo la posterior recuperación de Cr en cenizas (Falk-Windisch, et al., 2015). Esto, debido a que en trabajos previos de exploración para el pretratamiento de muestras, se encontró que las soluciones presentaban menor turbidez cuando las cenizas se trataban a mayor temperatura y durante más tiempo (datos no incluidos en este trabajo). En estudios previos reportados

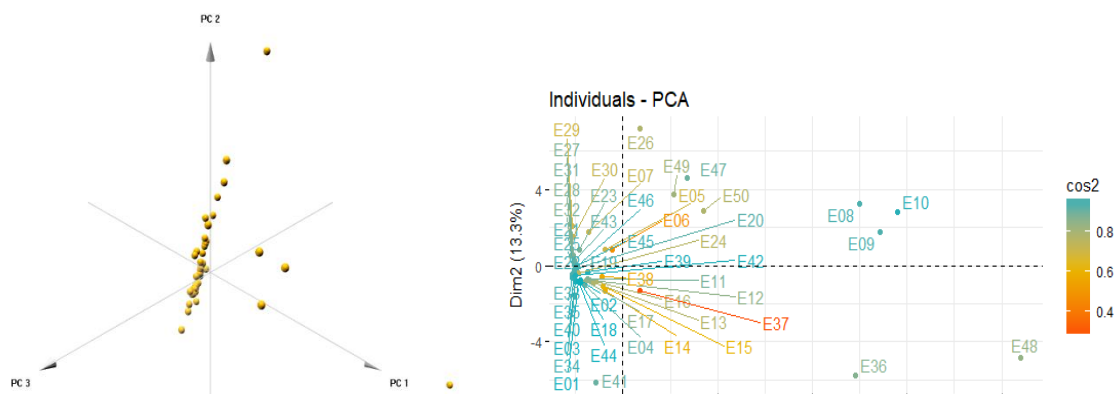
para el manejo de muestras de heces con contenido de Cr y Ti se muestran mejores recuperaciones cuando se realiza la incineración adecuada de las muestras (Ohmori et al, 2013, Schmid et al., 2001).

### **2.4.3 Selección de longitud de onda**



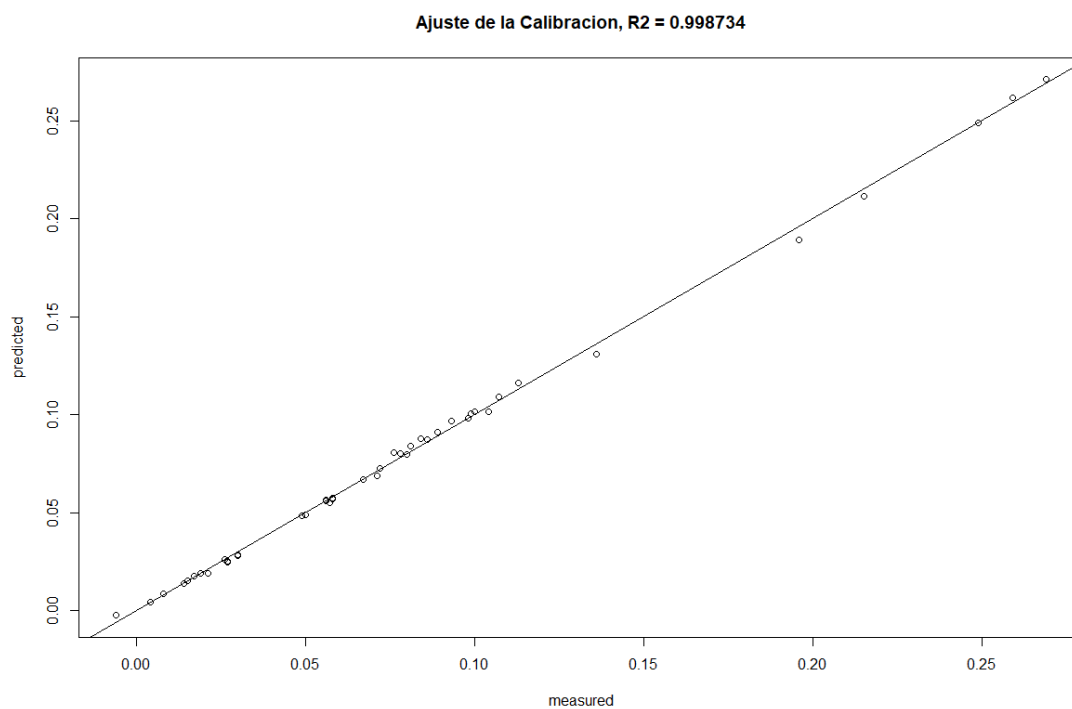
Inicialmente se lleva a cabo un análisis de componentes principales aplicado sobre la matriz de absorbancias previamente centrada y escalada mediante una transformación de variación normal estándar (SNV) con el fin de disminuir la dispersión de los datos, observar la estructura de los datos y detectar *outliers*. En la Figura 2-4a se observa la existencia de *outliers*, por lo que se utilizan los primeros 8 CPs que explican la totalidad de las varianzas para calcular las distancias de Mahalanobis como criterio de deflación. Se toma como hipótesis nula que, para todas las muestras provenientes del mismo sistema multivariado, se cumple que la distancia desde el centro del espacio  $n$ -dimensional de los CPs sigue una distribución Chi-cuadrada con  $n$  grados de libertad en un intervalo de confianza del 95%. El cálculo de las distancias, los estadísticos de prueba y los valores  $p$  se realizaron usando la función '*mahalanobisQC*' del paquete *ClassDiscovery* (Combes 2017). Se encuentra que para los tres primeros CPs, dos de las muestras no cumplen el criterio ( $p < 0.05$ ) de normalidad (Figura 2-1b) y se excluyen del proceso de acuerdo con la metodología de filtro para *PLS-VIP*. El proceso de detección y deflación se repite dos veces más hasta que todas las muestras se encuentren en el intervalo de confianza. A partir de este procedimiento, se eliminan en total seis espectros, correspondientes a cinco muestras con contenidos de cromo inferiores a 2.1 mgCr/kg y una de alimento para bovinos con contenido de marcador externo de 135 mgCr/kg, la cual se hallaba por fuera del rango de absorbancias de la matriz empleada y por ende fuera del intervalo de confianza establecido para la selección de la longitud de onda. En este punto, se encontró que la primera componente explica el 75.5% de la variación de los datos, la segunda un 13.3% y la tercera un 8.87% para un total acumulado del 97.64% (Tabla 2-4), por lo que se repite el PCA eliminando las variables con valores de proporción de varianza no significativa ( $> 0.05$ ) logrando la reducción de la dimensionalidad.

**Figura 2-4 a.** Representación tridimensional de scores en las CPs. **b.** Representación de los datos en las dos primeras CP



**Tabla 2-4** Parámetros componentes principales

	CP1	CP 2	CP 3	CP 4	CP 5	CP 6	CP 7	CP 8
Desviación estándar	5.3041	2.2218	1.8179	0.60441	0.41884	0.33839	0.21771	0.21023
Proporción	0.7552	0.1325	0.08871	0.00981	0.00471	0.00307	0.00127	0.00119
Acumulado	0.7552	0.8877	0.97642	0.98622	0.99093	0.994	0.99528	0.99646

**Figura 2-5** Ajuste de la calibración del modelo PLS

De acuerdo con el análisis de componentes principales, se reduce la matriz a las variables que tienen mayor peso correspondientes a las longitudes de onda entre 355 y 363 nm, y entre 430 y 465 nm, por lo que se usan estos grupos para el análisis de regresión por mínimos cuadrados. Se realiza el *PLS* usando el algoritmo de Wold (Wold et al., 1987) y se hace la verificación del modelo con el método *Cross Validation* (Efron, 1983). Para el proceso se toma un subconjunto aleatorio de calibración con  $k-1$  muestras y  $k$  iteraciones. Se calculó el *RSME* (Ec. 1-3) del modelo y el *RSMEP* para las predicciones, escogiendo finalmente la regresión con seis CPs cuyos resultados se resumen en la Tabla 2-5 por presentar el mejor ajuste de calibración y el menor error. La dispersión de los *scores* de los datos predichos y los obtenidos se muestran en la Figura 2-5. Se confirma así que el modelo es apto para la predicción de los *VIP* con un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.998 para la predicción, un *RSME* = 0.579 y un *CV* = 0.011% calculado como:

$$CV = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^n MSE_i \quad (2.4)$$

Donde  $MSE_i$  corresponde al cuadrado de la diferencia entre el valor medido y el predicho  $(y_i - \hat{y}_i)^2$ .

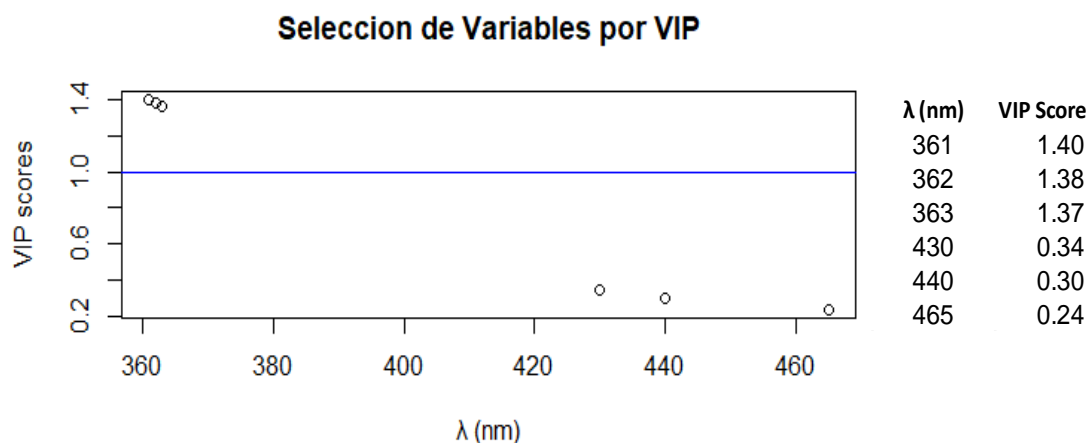
**Tabla 2-5** Parámetros estadísticos del modelo

VALIDATION: RMSEP							
Cross-validated using 10 random segments							
	Número de componentes principales						
	(Intercept)	1	2	3	4	5	6
<b>CV</b>	0.06759	0.005399	0.002284	0.0005629	1.46E-05	9.47E-07	1.44E-14
<b>adjCV</b>	0.06759	0.005389	0.002271	0.0004594	1.34E-05	8.78E-07	1.20E-14
<b>RMSE</b>	0.06605	0.03225	0.58731	0.71318	0.88294	0.88438	0.88444
TRAINING: % variance explained							
<b>X</b>		99.08	99.92	99.95	100	100	100
<b>Cr (mg/kg)</b>		99.39	99.9	100	100	100	100

Con base en los parámetros del modelo, se calculan las proyecciones de las variables de importancia con 6 CPs (Ec. 1.4), encontrando que los puntajes que cumplen el criterio ( $VIP > 1$ ) corresponden a las longitudes de onda entre 361 y 363 nm, siendo los de mayor importancia para la predicción de la concentración de Cr en las muestras, mientras que la  $\lambda$  de referencia reportada previamente para el método analítico ( $\lambda = 440$  nm) no explica de manera satisfactoria la variación, siendo incluso de menor relevancia que las otras encontradas por el sistema de reducción (Figura 2.6).

Con el estudio de los puntajes de las variables de importancia se establece que las  $\lambda$  apropiadas para el método colorimétrico de cuantificación de Cr son 361, 362 y 363 nm, que son las que se encuentran por encima del punto de corte en la representación grafica. Se establece el punto medio ( $\lambda = 362$  nm) como el óptimo para la validación analítica de este. Puesto que, en el análisis cualitativo de los estándares de referencia, se observa que existe un conjunto de longitudes donde se encuentran los máximos de absorción, (Figura 2-2), el sistema de *scores* permite definir con exactitud cuál es la  $\lambda$  adecuada en donde la predicción de los valores se ajusta con menor error.

**Figura 2-6** Puntuaciones de la proyección de variables de importancia (VIP)



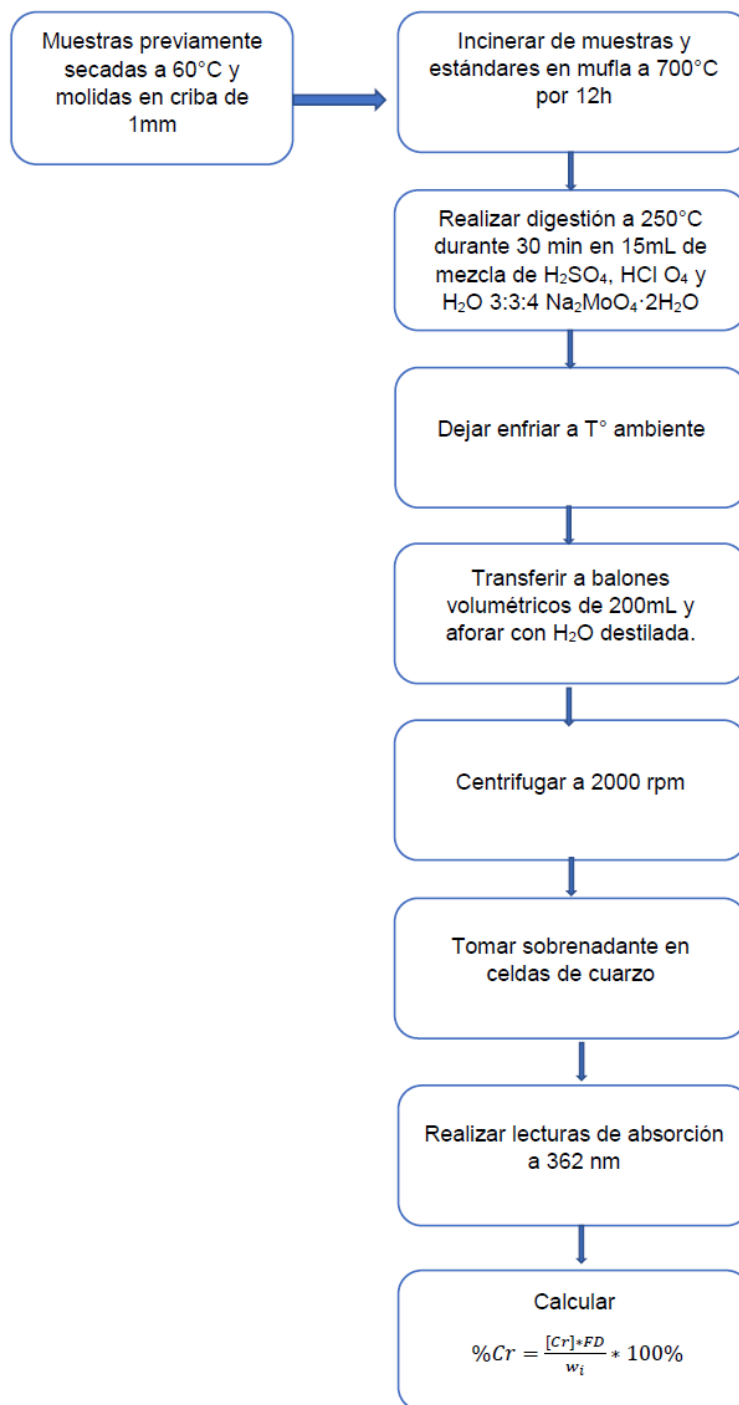
El estudio espectral realizado mediante análisis multivariado permite definir con precisión que la  $\lambda$  óptima de análisis es 362 nm, encontrando que la sensibilidad está ligada a esta, y que, contrario a lo usualmente reportado para la evaluación espectrofotométrica del dicromato (Starna, 2017b, Czarnoki et al 1961, Souza et al 2013), la  $\lambda$  de referencia para no es la mejor para la predicción del contenido de Cr en las muestras tratadas bajo este procedimiento. Esta discriminación, se observa en los scores de los VIP, en donde dichas longitudes de referencia ( $\lambda = 430, 440$  y  $465$ ), no son buenos predictores. A pesar de que la solución es coloreada y debería presentar mejor respuesta en el visible, su intensidad en esta región del espectro es débil y no permite cuantificar en los rangos de concentración de Cr que se encuentran en heces de animales que han sido dosificados con marcador externo en ensayos de digestibilidad.

Finalmente, definidos los factores críticos del método y las condiciones óptimas de cuantificación, se propone un protocolo de pretratamiento de muestra y cuantificación basado en la metodología de Fenton que incluya las modificaciones en las condiciones que optimizan la sensibilidad (Figura 2-7). El estándar para preparación de la curva de calibración debe someterse al mismo procedimiento tomando 0.03 g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y preparando la solución stock de 100 mgCr/kg. Posteriormente se realizan diluciones sucesivas en el rango de trabajo estimado de 3 a 25 mgCr/kg. El modelo de cálculo propuesto incluye el factor de dilución (FD) en mililitros y la concentración de Cr en mg/kg obtenida a partir de la curva, para muestras de 0.5g (*Wi*) pesados en balanza analítica.

## 2.5 Conclusiones

Los métodos de cuantificación de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  por espectrofotometría en estudios de digestibilidad animal tradicionalmente se han basado en la oxidación del Cr (III) a Cr (VI) en presencia de Mo (IV) propuesta por Fenton en 1979 debido a que las especies con esta valencia generan compuestos solubles que facilitan su análisis. En este trabajo se encuentra que dicha metodología contiene imprecisiones en la descripción del procedimiento, lo que ha conllevado a desestimar la pertinencia de su uso. Al evaluar los parámetros descritos en el procedimiento se encontró que fijar las condiciones para cuantificación del Cr, mejora la sensibilidad del método. En este sentido se recomienda

inicialmente, llevar a cabo la incineración de la muestra a tratar a 700 °C y no a 450 °C como está originalmente reportada debido a que se debe asegurar que la MO no sea interferente y que se garantice su oxidación completa en las cenizas. De acuerdo con lo encontrado en los ensayos de optimización, se demuestra la importancia de controlar la temperatura y el tiempo de digestión para garantizar un óptimo desarrollo del color y por ende de las mediciones espectrofotométricas, siendo a 250°C durante 30 minutos la condición idónea para mejorar la sensibilidad. Por otro lado, se encuentra que la matriz libre de analito tratada con la mezcla de ácidos no tiene efecto sobre las mediciones, pero el blanco presenta señal a lo largo del espectro, por lo que se hace necesario realizar los análisis usando esta mezcla tratada de la misma forma que las muestras para corregir la línea base debida a la presencia de los compuestos presentes en esta y no con agua destilada como se realiza usualmente. Adicionalmente, el método de selección de variables VIP, en armonía con el estudio espectral, demostró que la  $\lambda$  adecuada para el análisis es de 362nm y no 430 nm como es convencional. Con todas estas condiciones establecidas, se puede contar el método optimizado para su respectiva validación.

**Figura 2-7** Protocolo para la cuantificación de Cr por colorimetría

## 2.6 Bibliografía

- Akarachantachote, Noppamas Chadcham, S., & Saithanu, K. (2014). Cutoff Threshold Of Variable Importance In Projection For Variable Selection. *International Journal of Pure and Applied Mathematics*, 94(3), 307–322.
- Anderson, R. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. *Unodc*, 1, 76. <https://doi.org/ST/NAR/41>
- Ansari, T. H., Singh, R. A., & Yadava, Y. P. (1990). Electrical conduction in polycrystalline chromium molybdate. *Materials Letters*, 9(11), 469–473. [https://doi.org/10.1016/0167-577X\(90\)90120-B](https://doi.org/10.1016/0167-577X(90)90120-B)
- Balimane, P. V., Chong, S., & Morrison, R. A. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(1), 301–312. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00113-1)
- Cabral, Í. D. S., Azevêdo, J. A. G., Dos Santos Pina, D., Pereira, L. G. R., De Almeida, F. M., Souza, L. L., & De Lima, R. F. (2017). Evaluation of internal markers as determinants of fecal dry matter output and digestibility in feedlot sheep. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(5), 3331–3339. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3331>
- Carruthers, V. R., & Bryant, A. M. (1983). Evaluation of the use of chromic oxide to estimate the feed intake of dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 26(2), 183–186. <https://doi.org/10.1080/00288233.1983.10427057>
- Cohen, M. D., Kargacin, B., Klein, C. B., & Costa, M. (1993). Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(3), 255–281. <https://doi.org/10.3109/10408449309105012>
- Correa, H., Pabón, M., & Carulla, J. (2009). Estimation of dry matter intake of lactating Holstein cows under grazing in Antioquia. *Página 1 de 12 Estimación del consumo de materia seca en vacas Holstein bajo pastoreo en el trópico alto de Antioquia*. Estimation of dry matter intake of lactating Holste. *Livestock Research For Rural Development*, 21(4), 1–12.
- Costa, M., & Klein, C. B. (2006). Toxicity and Carcinogenicity of Chromium Compounds in Humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(2), 155–163. <https://doi.org/10.1080/10408440500534032>
- Czarnocki. (1960). The determination of chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Can. J. Anim. Sci.*, 167–179.
- Czerkawski, et al. (1975). New inhibitors of methane production by rumen micro-organisms. Experiments with animals and other practical possibilities. *The British Journal of Nutrition*, 34(3), 447–457. <https://doi.org/10.1079/BJN19750012>
- Detmann, E., Paulino, M. F., Zervoudakis, J. T., Valadares Filho, S. de C., Euclides, R. F., Lana, R. de P., & Queiroz, D. S. de. (2001). Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5), 1600–1609. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000600030>
- Dianyi Yu, M. D. (2011). Chromium (Cr) Toxicity | ATSDR - CSEM, 1–67.
- Divakaran, S., Obaldo, L. G., & Forster, I. P. (2002). Note on the methods for



- determination of chromic oxide in shrimp feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 464–467. <https://doi.org/10.1021/jf011112s>
- Eastmond, D. A., MacGregor, J. T., & Slesinski, R. S. (2008). Trivalent chromium: Assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(3), 173–190. <https://doi.org/10.1080/10408440701845401>
- Efron, B. (1983). Estimating the Error Rate of a Prediction Rule: Improvement on Cross-Validation. *Journal of the American Statistical Association*, 78(382), 316–331. <https://doi.org/10.1080/01621459.1983.10477973>
- Executive, S. H. (2013). Chromium and you. Working with chromium - are you at risk? INDG346, *INDG346*(rev1), 1–4. Retrieved from <http://www.hse.gov.uk/pubns/indg346.pdf>
- Falk-Windisch, H., Svensson, J. E., & Froitzheim, J. (2015). The effect of temperature on chromium vaporization and oxide scale growth on interconnect steels for Solid Oxide Fuel Cells. *Journal of Power Sources*, 287, 25–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2015.04.040>
- Fenton, T. ., & Fenton, M. (1979). An Improved Procedure For The Determination Of Chromic Oxide In Feed And Feces. *Canadian Journal of Animal Science*, 63, 631–634. <https://doi.org/10.4141/cjas79-081>
- Ferreira, M. D. A., Campos, S. De, Filho, V., & Inácio, M. (2009). Revista Brasileira de Zootecnia Avaliação de indicadores em estudos com ruminantes : digestibilidade Evaluation of markers in ruminant trials : digestibility Material e Métodos, 3598.
- Gallego Gutiérrez, A. L. (2009). *Instrumento portátil para medición de compuestos fenólicos en vino tinto usando espectroscopía Raman*. Retrieved from <https://www.repositorio.uc.cl/bitstream/handle/11534/1365/530505.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Garcia, W. (2013). *Potencial de la suplementación con biomasa obtenida a partir de la producción de bioetanol en ganaderías de clima frío dedicadas a la producción de leche*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/11696/1/98669231.2013.pdf>
- Gilchrist, A., & Nobbs, J. (1999). Colorimetry, Theory. In J. C. Lindon (Ed.), *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (pp. 337–343). Oxford: Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/rwsp.2000.0044>
- Guzman-Cedillo, A. E., Corona, L., Castrejon-Pineda, F., Rosiles-Martínez, R., & Gonzalez-Ronquillo, M. (2017). Evaluation of chromium oxide and titanium dioxide as inert markers for calculating apparent digestibility in sheep. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 275–279. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1174124>
- Haney, J. T., Erraguntla, N., Sielken, R. L., & Valdez-Flores, C. (2014). Development of an inhalation unit risk factor for hexavalent chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(2), 201–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.12.005>
- Hseu, Z.-Y. (2004). Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods. *Bioresource Technology*, 95(1), 53–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.008>
- Icontec. (2005). Norma Técnica Colombiana NTC-ISO / IEC 17025. In *Norma Técnica*

- Colombiana* (p. 49). Retrieved from [https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC\\_17025-2005.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC_17025-2005.pdf)
- Juan, P., Josep, E., & Samuel, C. (2015). Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. In *Analytical Separation Science* (pp. 1757–1808). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064>
- Kasper, C. (1935). Mechanism of chromium deposition from the chromic acid bath. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 9(6), 353–375. Retrieved from <https://archive.org/details/jresv14n6p693>
- Kimbrough, D. E., Cohen, Y., Winer, A. M., Creelman, L., & Mabuni, C. (1999). A Critical Assessment of Chromium in the Environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29(1), 1–46. <https://doi.org/10.1080/10643389991259164>
- Kimura, F. T., & Miller, V. L. (1957). Chromic Oxide Measurement, Improved Determination of Chromic Oxide in Cow Feed and Feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(3), 216. <https://doi.org/10.1021/jf60073a008>
- Kumar, R., Mishra, R. K., Mishra, V., Qidwai, A., Pandey, A., Shukla, S. K., ... Dikshit, A. (2016). Chapter 13 - Detoxification and Tolerance of Heavy Metals in Plants. In P. Ahmad (Ed.), *Plant Metal Interaction* (pp. 335–359). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00013-8>
- Latimer, G. W., & AOAC International. (2012). Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Appendix F, pages 1-17. Retrieved from [www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)
- Lehnert, B. (2015). BlandAltmanLeh: Plots (Slightly Extended) Bland-Altman Plots. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=BlandAltmanLeh>
- Lippke, H. (2002). Estimation of forage intake by ruminants on pasture. *Crop Science*, 42(3), 869–872. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.8690>
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118, 62–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.07.010>
- Meseguer Lloret, S. (2017). Ensayos estadísticos para comparar las pendientes de 2 rectas de calibrado: Caso práctico para varianzas homogéneas. Retrieved from <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/84444>
- Morgan, N. K., Scholey, D. V., & Burton, E. J. (2014). A comparison of two methods for determining titanium dioxide marker content in broiler digestibility studies. *Animal*. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000068>
- Myers, W., Ludden, P., BW, & Nayigihugu, V. (2004). Technical Note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide 1. *Journal of Animal Science*, 82(1), 179–183. <https://doi.org/10.2527/2004.821179x>
- Njaa, L. R. (1961). Determination of Protein Digestibility with Titanium Dioxide as Indicator Substance. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 11(3–4), 227–241.

- <https://doi.org/10.1080/00015126109434994>
- Park, R., Bena, J., Stayner, L., Smith, R., Gibb, H., & Lees, P. S. (2004). Hexavalent Chromium and Lung Cancer in the Chromate Industry: A Quantitative Risk Assessment. *Risk Analysis*, 24(5), 1099–1108. <https://doi.org/10.1111/j.0272-4332.2004.00512.x>
- Pechova, A., & Pavlata, L. (2007). Chromium as an essential nutrient: A review. *Veterinarni Medicina*, 52(1), 1–18. <https://doi.org/10.1006/rtp.1997.1136>
- Pope, M. T., & Müller, A. (1991). Polyoxolometalate chemistry - An old field with new dimensions in several disciplines. *Angewandte Chemie International Edition*, 30(1), 34–48. <https://doi.org/10.1002/anie.199100341>
- Prado, F. E., Hilal, M., Chocobar-Ponce, S., Pagano, E., Rosa, M., & Prado, C. (2016). Chapter 6 - Chromium and the Plant: A Dangerous Affair? In P. Ahmad (Ed.), *Plant Metal Interaction* (pp. 149–177). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00006-0>
- Ratasuk, N., & Nanny, M. A. (2007). Characterization and Quantification of Reversible Redox Sites in Humic Substances. *Environmental Science & Technology*, 41(22), 7844–7850. <https://doi.org/10.1021/es071389u>
- Reichenbacher Mandred, E. J. W. (2011). *Challenges in Analytical Quality Assurance*. Jena, Germany: Springer.
- Rocha, G. C., Palma, M. N. N., Detmann, E., & Filho, S. de C. V. (2015). Evaluation of acid digestion techniques to estimate chromium contents in cattle feces. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50(1), 92–95. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100010>
- Şahan, S., Saçmaci, Ş., Kartal, Ş., Saçmaci, M., Şahin, U., & Ülgen, A. (2014). Development of a new on-line system for the sequential speciation and determination of chromium species in various samples using a combination of chelating and ion exchange resins. *Talanta*, 120, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.030>
- Sakita, G. Z., Meira, D. C., Bremer Neto, H., Cyrino, J. E. P., & Abdalla, A. L. (2015). Chromium oxide (51Cr2O3) used as biological marker was not absorbed by fish. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(3), 755–762. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7493>
- Salonen, K. (1979). The Selection of Temperature for High Temperature Combustion of Carbon. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 7(6), 591–597. <https://doi.org/10.1002/ahch.19790070607>
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Valente, T. N. P., Souza, M. A., Filho, S. C. V., & Paulino, M. F. (2011). Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle 1 Recuperação fecal e vício de tempo longo de indicadores internos e externos em ensaio de digestão com bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 174–182. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300026>
- Sandoval, S. (2010). Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. *Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki*, 66. Retrieved from [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia\\_Tecnica\\_1](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Tecnica_1)

- validaci?n de M?todos y determinaci?n de la incertidumbre de la medici?n\_1.pdf
- Shupack, S. I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspectives*, 92(1), 7–11.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.91927>
- Sinex, S. A., Cantillo, A. Y., & Helz, G. R. (1980). Accuracy of Acid Extraction Methods for Trace Metals in Sediments. *Analytical Chemistry*, 52(14), 2342–2346.  
<https://doi.org/10.1021/ac50064a023>
- Soergel, K. H. (1968). Inert Markers. *Gastroenterology*, 54(3), 449–452.  
[https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(68\)80107-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(68)80107-6)
- Souza, N. K. P., Detmann, E., Pina, D. S., Valadares Filho, S. C., Sampaio, C. B., Queiroz, A. C., & Veloso, C. M. (2013). Evaluation of chromium concentration in cattle feces using different acid digestion and spectrophotometric quantification techniques. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 65(5), 1472–1482. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000500028>
- Sprinkle, J. E., Kress, D. D., Doornbos, D. E., Anderson, D. C., & Tess, M. W. (1995). Chromic oxide contamination ly used in marker studies of pasture previous-, 48(May), 194–197.
- Starna, S. (2017). *Why do we need Reference Materials ?* Retrieved from <https://www.starna.com/reference-materials>
- Szabó, M., Kalmár, J., Ditrói, T., Bellér, G., Lente, G., Simic, N., & Fábián, I. (2018). Equilibria and kinetics of chromium(VI) speciation in aqueous solution – A comprehensive study from pH 2 to 11. *Inorganica Chimica Acta*, 472, 295–301.  
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.038>
- Takahama, S., & Dillner, A. M. (2015). Model selection for partial least squares calibration and implications for analysis of atmospheric organic aerosol samples with mid-infrared spectroscopy. *Journal of Chemometrics*, 29(12), 659–668.  
<https://doi.org/10.1002/cem.2761>
- Titgemeyer, E. C., Armendariz, C. K., Bindel, D. J., Greenwood, R. H., & Löest, C. A. (2001). Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science*, 79(4), 1059–1063. <https://doi.org/2001.7941059x>
- Tzeng, D. Y., & Berns, R. S. (2005). A review of principal component analysis and its applications to color technology. *Color Research and Application*, 30(2), 84–98.  
<https://doi.org/10.1002/col.20086>
- Valencia, D. M. (2015). *Efecto de la suplementación de dietas para vacas lecheras con glicerina cruda, sobre algunos parámetros de la fermentación ruminal, producción y calidad composicional de la leche*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/46450/1/43256640.2015.pdf>
- Vega, G. A., Cubillos, S. D., & Ruiz, J. (2016). NEUTRAL DENSITY FILTERS CALIBRATION FOR SPECTROPHOTOMETRIC LABORATORIES CALIBRACIÓN DE FILTROS DE DENSIDAD NEUTRA PARA.
- Verbinnen, B., Billen, P., Van Coninckxloo, M., & Vandecasteele, C. (2013). Heating Temperature Dependence of Cr(III) Oxidation in the Presence of Alkali and Alkaline Earth Salts and Subsequent Cr(VI) Leaching Behavior. *Environmental Science & Technology*, 47(11), 5858–5863. <https://doi.org/10.1021/es4001455>

- Wang, Y., Hu, L., & Lu, G. (2015). Health Risk Assessments Based on Existing Data of Arsenic, Chromium, Lead, and Zinc in China's Air. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 21(2), 560–573. <https://doi.org/10.1080/10807039.2014.934602>
- Whitby, L. G., & Lang, D. (1960). Experience with the chromic oxide method of fecal marking in metabolic balance investigations on humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 39(1), 854–863. <https://doi.org/10.1172/JCI1104106>
- Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1), 37–52. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- World Health Organization. (2014). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, (April 2014), 60. Retrieved from <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/internrep/14-002.pdf>

### **3. Validación de un método colorimétrico para la cuantificación de Cr en heces y alimentos**

#### **3.1 Resumen**

El objetivo en este capítulo fue validar un método para cuantificar cromo en heces bovinas y alimentos para rumiantes mediante espectrofotometría visible. Se utilizó la metodología de Fenton (1979) modificada, para lo cual se optimizaron los parámetros: temperatura y tiempo de incineración, de digestión y longitud de onda para el análisis. Las muestras (estándares, heces y alimentos con contenido de Cr) fueron incineradas a 700 °C y posteriormente se llevaron a digestión ácida usando una mezcla de  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}$  en proporción 3:3:4 a 250 °C durante 30 minutos. Se determinaron los contenidos de Cr en un espectrofotómetro UV-Vis a 362 nm. Para la validación, se evaluó selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud, y estabilidad. Con el análisis de selectividad se encontró que no se presentan interferencias en la longitud de onda seleccionada para el análisis de muestras con  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y que la recuperación del Cr no es significativamente diferente en presencia de  $\text{TiO}_2$  ( $p < 0.05$ ). La linealidad fue satisfactoria con  $R^2$  de 0.996, en un rango de concentraciones de Cr entre 3 y 30  $\text{mg L}^{-1}$ . La precisión intermedia se evaluó en tres niveles diferentes de concentración, entre analistas y en cinco días no consecutivos con un  $RSD$  de 3.63%. La exactitud se determinó en muestras de heces enriquecidas con estándar de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  y se

obtuvieron porcentajes de recuperación entre 97-102%. El límite de detección estuvo por debajo de los niveles de Cr de interés para las matrices estudiadas y se estableció un *LOD* de 2.9 mg Cr/kg y un *LOQ* de 3.6 mgCr/kg. La estabilidad del complejo se determinó por medición de absorbancias en los días 1, 30, 60 y 180 en muestras de heces bovinas enriquecidas con 15 y 25 mgCr/kg MS, encontrando que no hubo cambios significativos en la absorción de las muestras durante este periodo ( $p>0.05$ ). Los parámetros de validación indican que el método es satisfactorio para la cuantificación de Cr en heces y alimentos para rumiantes como alternativa analítica de fácil aplicación y bajo costo.

## 3.2 Introducción

El uso del óxido de cromo como marcador inerte para la estimación de producción de heces y radios de digestibilidad en diferentes especies animales ha tenido una gran acogida por más de cincuenta años (Cabral et al., 2017; Czarnocki, 1960; Czerkawski, 1975; Kimura & Miller, 1957; Whitby & Lang, 1960). Hoy, se tiene claridad acerca de cuáles son los factores que más afectan la variabilidad de los resultados obtenidos en estudios de consumo de rumiantes, dentro de los que se cuentan patrones de dosificación y muestreo, periodos de adaptación del animal al marcador, métodos de dosificación, el tipo de alimento y los métodos de cuantificación (Cabral et al., 2017; Carruthers & Bryant, 1983). Este último, ha sido abordado desde la comparación de las técnicas usadas para la recuperación del cromo en las muestras, en donde generalmente se usan el método de absorción atómica (FASS) y el espectrofotométrico. A pesar de que se ha preferido el uso de FASS en los últimos años, el método colorimétrico ofrece varias ventajas como las discutidas previamente, por lo que su uso e implementación sigue siendo importante en el área.

En ese sentido, se requiere que el método ofrezca ventajas analíticas frente a otras tecnologías de alto costo tal que su uso no imprima mayor variabilidad a las estimaciones de digestibilidad, sino que por el contrario su aporte a la incertidumbre sea el mínimo posible. Esto implica necesariamente que el protocolo empleado para la cuantificación se ejecute de manera metódica y siguiendo parámetros internacionales para tal fin, por lo que la validación del método provee una herramienta que aporta la evidencia necesaria para garantizar el control de la calidad analítica y el aseguramiento de resultados. Debido

a que en Colombia solo se cuenta con protocolos y técnicas validadas como respuesta a requerimientos de la legislación, se ha dejado de lado la importancia de establecer validaciones de métodos de cuantificación en las áreas de investigación agropecuaria, encontrando con frecuencia que las altas variabilidades en los resultados de consumo se asocian erróneamente al método analítico. Surge así la necesidad de contar con técnicas estandarizadas para la cuantificación de marcadores inertes a través de parámetros definidos por protocolos internacionales, de manera que su alcance, precisión intermedia, exactitud, linealidad y demás criterios de validación permitan cuantificar con incertidumbre aceptable el contenido de marcadores en las muestras para estudios de consumo.

Cuando se desarrollan procedimientos para la determinación de un analito, se toman métodos de la literatura, de otros laboratorios, o se realizan modificaciones sobre protocolos estandarizados, es necesario probar que estos cumplen con su alcance y que los resultados obtenidos tienen un grado aceptable de confiabilidad. Esta evidencia se obtiene a través de la validación analítica del método a usar (Juan, Josep, & Samuel, 2015). Dado que no existe una guía única que establezca un protocolo para la cuantificación de cromo en heces y alimentos para estudios de digestibilidad y consumo de rumiantes, el objetivo de este trabajo es proponer un plan de validación en armonía con las guías estandarizadas internacionalmente para aseguramiento de calidad analítica y evaluar los parámetros de validación más relevantes de acuerdo con el alcance y las limitaciones del método; estos son selectividad, precisión intermedia, linealidad, límites de detección, exactitud y estabilidad.

## **3.3 Materiales y métodos**

### **3.3.1 Materiales**

Se utilizó óxido de cromo III ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , Merck, 99%) como marcador para la dosificación de los animales y para las soluciones estándar de laboratorio. La mezcla digestora se



preparó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 70% (Merck),  $\text{HClO}_4$  al 70% (Panreac), agua destilada en relación 3:3:4, respectivamente, y adición de 0,02 kg/L de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (99%, Sigma Aldrich). Para todas las mediciones se utilizó un espectrofotómetro UV-line 900 Schott y celdas de cuarzo. Para el tratamiento de residuos se empleó NaOH sólido (Merck). Como matriz libre de analito ( $\text{H}_0$ ), se utilizaron heces tomadas *in situ* de seis vacas Holstein multíparas no dosificadas con el marcador, localizadas en la Estación Agraria “Paysandú” de la Universidad Nacional, Medellín (ubicada a 2600 msnm, con una temperatura media de 14 °C, precipitación media de 2500 mm y una humedad relativa promedio de 80 %, en una formación ecológica bh-MB según la clasificación de Holdrige). Como material de referencia, se tomaron porciones de 5.0 g de matriz libre ( $\text{H}_0$ ) enriquecidas con  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  tal que su concentración nominal fuera de 15 mg/kg MS de Cr. Se utilizó dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ , Panreac 99%) en el análisis de interferencias.

### 3.3.2 Preparación de muestras y soluciones stock

Todas las muestras, materiales de referencia y estándares fueron sometidos al procedimiento propuesto en el Capítulo 2 para la estimación de Cr. En la fabricación del material de referencia se usaron muestras de heces sin contenido de cromo ( $\text{H}_0$ ) secadas a 60°C por cinco días en estufa convectiva de aire forzado y molidas en un molino de cuchillas (Fritsch Idar Oberstein®- Germany) con criba de 1 mm. Todas las muestras y los estándares fueron sometidos a calcinación durante 12 horas a 700°C en mufla (Terragen) con control de temperatura. Las cenizas se transfirieron a tubos tipo Kjeldahl para digestión con la mezcla digestora durante 30 minutos a 250°C. Una vez enfriados los tubos a temperatura ambiente, los blancos, la matriz y las muestras se aforaron con agua destilada a 200 mL en balones volumétricos y se homogenizaron mediante agitación con vortex a 2000 rpm. En tubos Falcon se tomaron alícuotas de 15 mL y se llevaron a centrifugación refrigerada a 4°C durante 4 minutos a 2000 rpm. La solución sobrenadante se llevó a celdas de cuarzo y se realizaron las lecturas a 362 nm en un espectrofotómetro UV-line 900 (Schott).

Las soluciones stock se prepararon de manera independiente por cada ensayo, transfiriendo 0.03 g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  a crisoles de porcelana sometidos al mismo procedimiento que las muestras. Posteriormente se llevaron a un volumen final de 200 mL. Para las

soluciones de trabajo se realizaron diluciones sucesivas a partir de la solución stock utilizando micropipetas electronicas Handystep® con puntas estériles desechables de 1, 5 y 10 mL. Todas las soluciones se prepararon diariamente.

### **3.3.3 Tratamiento de residuos**

Los residuos se recolectaron en un erlenmeyer de vidrio y se llevaron a un pH de 10 con una solución de NaOH al 33%. Una vez inducida la precipitación, se filtró en papel Witham N°1 y se tomaron alícuotas de control para análisis instrumental. El residuo sólido se secó en estufa de aire forzado a 60 °C y el filtrado se evaporó en campana de extracción a 70 °C en una plancha de calentamiento con control de temperatura para llevar a posterior neutralización.

## **3.4 Plan de validación**

### **3.4.1 Selectividad**

Se validó la capacidad del método para cuantificar el cromo de forma inequívoca a través del estudio de los espectros de absorción entre 200 y 700 nm. Con el fin de evitar las contribuciones debidas a la mezcla de digestión, ésta se utiliza como blanco siendo sometida al mismo proceso y dilución que las muestras y los estándares. Se evaluaron los espectros de un set de 46 muestras procesadas entre estándares, material de referencia con y sin adición de Cr y Ti y muestras de ensayo (heces y alimentos provenientes de experimentos de campo). En la Tabla 3-1 se relaciona la identificación de los espectros utilizados en la comparación cualitativa. La selección de la longitud de onda óptima ( $\lambda_{\text{max}}=362\text{nm}$ ), se realizó con el criterio obtenido del análisis de *PLS-VIP* desarrollado en el capítulo anterior.

El criterio de aceptación para la selectividad se establece considerando que no se presente señal a la  $\lambda_{\max}$  seleccionada para la matriz  $H_0$ . Se consideran como interferencias aquellas señales que se solapan con la del analito o que presenten distorsiones de la línea base en las que la absorción en términos de concentración de Cr sea significativamente diferente a la señal de referencia ( $p > 0.05$ ). Para las interferencias conocidas, se evalúa por triplicado la recuperación de Cr en  $H_{Cr}$  y  $H_{Cr-Ti}$  bajo este criterio.

**Tabla 3-1** Identificación de muestras utilizadas en análisis de selectividad

Identificación	Muestra	Concentración nominal en solución (mg/kg Cr)
B	Mezcla digestora (Blanco)	Sin adición de $Cr_2O_3$
H0	Heces libres de Cr	Sin adición de $Cr_2O_3$
HCr15	Heces enriquecidas	15
HCr30	Heces enriquecidas	30
STD30	Solución estándar	30
ACr	Alimento dosificado	25
M1	Muestra de prueba	NR

### 3.4.2 Linealidad y rango

La linealidad se evaluó mediante análisis de regresión lineal ponderada. Para ello, se prepararon tres soluciones stock tomando 0.03 g de  $Cr_2O_3$  en crisoles de porcelana y sometidos al mismo protocolo que las muestras. Para cada stock se realizó una curva de calibración con cinco niveles ( $k=5$ ) por triplicado durante días no consecutivos ( $p=3$ ). Las soluciones de trabajo se prepararon a partir de diluciones sucesivas de la solución stock con concentraciones de 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 y 30 mg/kg de Cr usando como diluyente agua destilada. Para evaluar la diferencia observada entre los valores de absorción y los predichos, se evaluó la normalidad de los residuales y el ajuste del modelo con el coeficiente de correlación  $r$ , estableciendo como criterio de normalidad  $p < 0.05$ . Se realizó un ajuste de regresión ponderada considerado lineal si en el análisis de varianza, la regresión es significativa ( $p < 0.05$ ) y la pendiente es estadísticamente diferente de cero ( $p < 0.05$ ).

El límite de detección ( $LOD$ ) y el de cuantificación ( $LOQ$ ) se calcularon a partir del promedio de la señal  $y_0$  para nueve blancos preparados de manera independiente, reportado en términos de la variable  $x$  del modelo de ajuste de la regresión lineal ponderada:

$$LOD = \frac{(\bar{y}_0 + 3 * S_y) + a_w}{b_w} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

$$LOQ = \frac{(\bar{y}_0 + 10 * S_y) + a_w}{b_w} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

### 3.4.3 Precisión intermedia

Para la evaluación de la precisión intermedia, definida como el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes, se usaron tres muestras de heces diferentes ( $H_0$ ), enriquecidas con Cr de forma individual por analista en concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120% del valor central esperado en las muestras de ensayo (12, 15 y 18 mgCr/kg, respectivamente), cada una por duplicado. Se calculó la concentración a partir de la curva de calibración establecida en el ensayo de linealidad. El procedimiento se repitió por cada analista en cinco días diferentes no consecutivos. El método se considera preciso si se obtiene un % $RSD$  global por debajo de 5%.

### 3.4.4 Exactitud

El análisis de exactitud expresado como el grado de concordancia entre el valor que se acepta como un valor de referencia aceptado y el valor encontrado, se evaluó a través de un estudio de recuperación del analito en el material fabricado a partir de tres muestras individuales del  $H_0$  enriquecidas con 15 mg/kg de Cr analizadas por duplicado. Se determinó el porcentaje de recuperación (Ec. 3.3) y se evaluó mediante un análisis de varianzas. El criterio de aceptación es que no haya diferencia significativa entre los

valores encontrados y que el rango de recuperación esté entre 90 y 108%, equivalente a un error inferior al 5%.

$$\%R = \frac{Cr_{calculado}}{Cr_{teórico}} * 100\% \quad (3.3)$$

### 3.4.5 Estabilidad

Se evaluó la estabilidad del analito a partir de la medición del Cr en tres muestras de H<sub>0</sub> enriquecidas con 15 y 25 mg/kg de Cr, preparadas según el protocolo y almacenadas durante 180 días. Se realizan mediciones en los días 1, 30, 60 y 180, teniendo como criterio de aceptación que la varianza entre días no sea significativa ( $p > 0.05$ ) mediante un análisis de varianza de un factor.

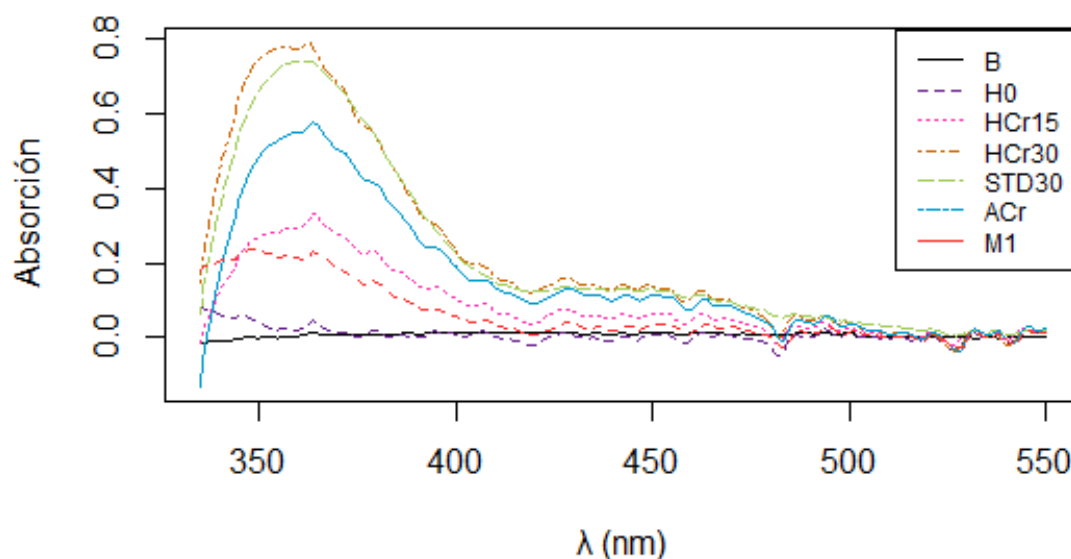
## 3.5 Resultados y discusión

### 3.5.1 Selectividad

Con el fin de evitar los posibles efectos asociados a los ácidos con los que se llevó a cabo la digestión, todos los análisis se hicieron tomando como blanco la mezcla digestora luego de ser sometida al mismo procedimiento que las muestras. La superposición de los espectros de las muestras relacionadas en la Tabla 3-1, revelan que la matriz libre (H<sub>0</sub>) no presenta señales significativas en la longitud de onda seleccionada para el análisis (Figura 3-1). Dado que los animales utilizados en los ensayos de consumo suelen dosificarse con Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> peletizado con suplementos o concentrado cuando no se cuenta con cápsulas u otro vehículo para su suministro, se usaron muestras de este tipo de alimento para rumiantes con el marcador (A<sub>Cr</sub>) y se analizaron bajo los mismos parámetros con el fin de observar si se presentaba alguna interferencia debido a la

composición del pellet. La composición bromatológica del alimento utilizado en este estudio es la descrita por Ramírez (2017).

**Figura 3-1** Análisis de selectividad para la determinación de Cr por Uv-Vis



Es usual encontrar estudios de evaluación de marcadores en los que se prueban simultáneamente el  $\text{TiO}_2$  y el  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , por lo que es posible que el titanio pueda ser interferente en el método y se hace necesario evaluar si las muestras con contenido de Ti pueden llegar a afectar la recuperación del Cr en las muestras. Dado que en ensayos de recuperación de marcadores, el Ti suele cuantificarse por espectroscopía visible y en medios ácidos, se hace necesario comprobar que en la  $\lambda$  de análisis para Cr, no se presenten interferencias, pues la comparación cualitativa no es suficiente y se precisa establecer si el Cr en la muestra es recuperable en su totalidad y si la adición o presencia del Ti afecta de manera significativa la concentración calculada con el método. Para ello, se utilizaron seis muestras independientes de heces ( $H_0$ ) enriquecidas con una concentración nominal de 15 mg/kg de Cr. De cada muestra se tomó una porción para enriquecer con 15mg/kg de Ti ( $H_{\text{Cr-Ti}}$ ). Todas las muestras fueron procesadas bajo el protocolo desarrollado y se calculó la recuperación de Cr en términos de la concentración de cromo. Los valores obtenidos para la concentración de Cr recuperado se muestran en la Tabla 3-2. Se realizó una prueba de contraste  $F$  para comparación de varianzas suponiendo que no existen diferencias significativas entre ellas ( $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ ). Se encontró que el valor del estadístico de prueba  $F > F_{\text{crit}}$  y que las varianzas entre los

grupos de muestras  $H_{Cr}$  y  $H_{Cr-Ti}$  son desiguales, ( $p=0.079$ ). Para definir si la variación se debe a errores aleatorios, se realiza un contraste de significancia  $t$  para varianzas desiguales bajo la misma hipótesis nula. Dado que el  $t$  calculado no supera el valor crítico, la hipótesis se acepta y se concluye que no hay diferencia significativa entre las medias ( $p>0.05$ ).

**Tabla 3-2** Análisis de interferencias (Ti) en la determinación de Cr por UV-vis

Concentración de Cr (mg/kg)		
	Nominal ( $H_{Cr}$ )	Recuperado ( $H_{Cr-Ti}$ )
	14.4	14.8
	14.9	14.9
	14.6	14.7
	14.9	14.9
	14.6	14.9
	14.7	14.9
Media	14.70	14.86
Varianza	0.043	0.011

**Tabla 3-3** Parámetros estadísticos para el análisis de interferencias

Contraste F y t	
F	3.92345
$P(F \leq f)$ una cola	0.07991
Valor crítico para F (una cola)	5.05033
Estadístico t	1.77207
$P(T \leq t)$ una cola	0.05984
Valor crítico de t (una cola)	1.89458

Se determina así, que el método es selectivo para la cuantificación de Cr en heces de origen bovino y alimentos. El análisis espectral muestra que a pesar de que la matriz presenta señal a lo largo del espectro ultravioleta y visible, ésta no es interferente a la longitud de onda de estudio. Los demás efectos asociados a la absorción de la mezcla de digestión y al solvente, se corrigen usando como blanco dicha mezcla tratada de la

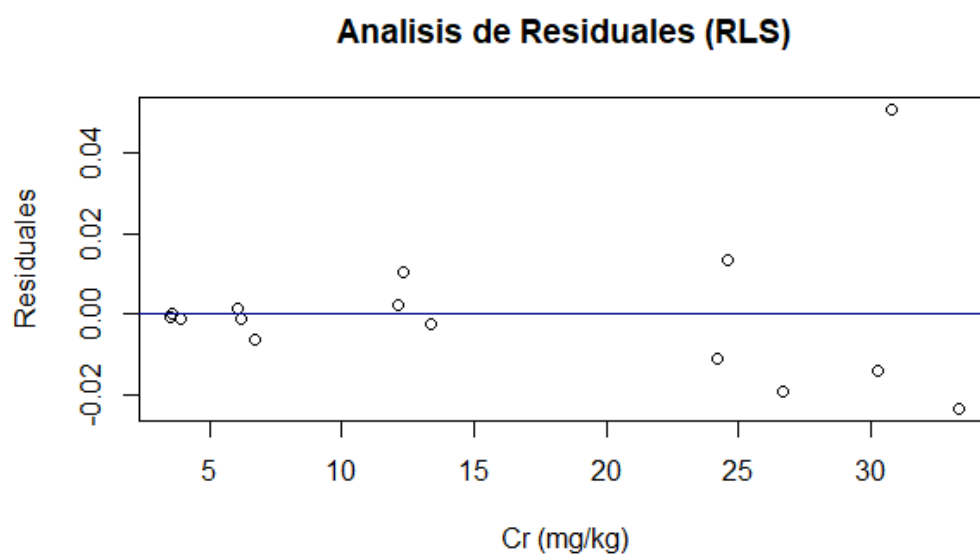
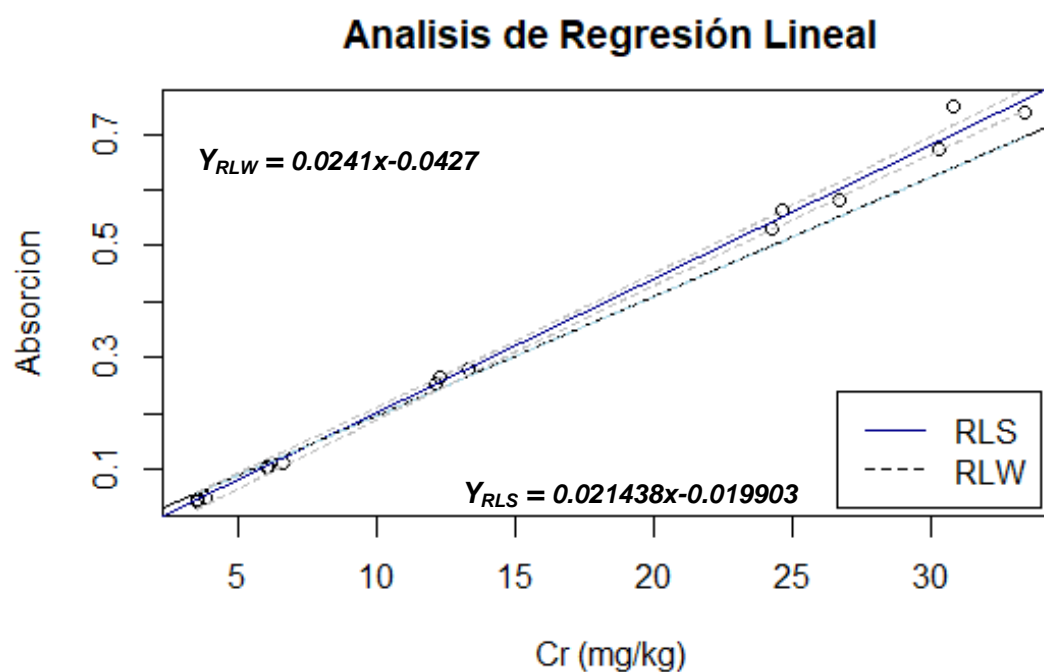
misma manera que las muestras. Por otro lado, se demuestra la capacidad del método para cuantificar cromo en presencia de titanio, por tanto, no hay efecto significativo en la recuperación de éste cuando el  $\text{TiO}_2$  está presente en la matriz de estudio.

### 3.5.2 Linealidad y rango

Las curvas de calibración realizadas por triplicado en cinco niveles preparadas a partir de estándares procesados de manera individual fueron analizadas por el método de mínimos cuadrados. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.998, un  $R^2$  de 0.996 y un error estándar de 0.018. Mediante este modelo se puede observar que el método es lineal en el rango de concentraciones evaluado y existe correlación significativa entre las variables ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el análisis de residuales muestra que existe heterocedasticidad (Figura 3-2), es decir, se observó que los errores en la dirección del aumento de la concentración también se incrementaban, por lo que se realizó un ajuste de regresión ponderado (RLW) tomando como factor de ponderación  $w_i = 1/x_i$  dado que la varianza es proporcional al predictor  $x$ . El valor  $F > F_{crit}$  para la regresión, indica, además, que la varianza es heterogénea y se puede realizar la ponderación.

Se calcula entonces la recta de regresión ponderada con el fin de proporcionar un mejor ajuste sobre los puntos donde el error es mayor. Para ello se realizan ponderaciones individuales de acuerdo con la Ec. 1.12. y se recalcula la pendiente y el intercepto con las nuevas coordenadas del centro de gravedad. La figura 3-3 muestra los modelos de regresión lineal simple y ajustado, en donde se observa como la corrección ponderada mejora el ajuste para los datos con mayor dispersión.



**Figura 3-2** Análisis de residuales para la regresión lineal simple (RLS)**Figura 3-3** Modelos de regresión lineal simple y ponderado

**Tabla 3-4** Análisis de varianza para los modelos de regresión lineal simple y ponderada

		<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Fcrit</b>
<b>RLS</b>	Regresión	1	1.02151	1.02151	3213.5	5.90537E-17
	Residuos	13	0.00413	0.00032		
	Total	14	1.02564			
<b>RLW</b>	Regresión	1	0.80613	0.80613	5.22561E+32	8.1164E-207
	Residuos	13	2.005E-32	1.54265E-33		
	Total	14	0.806131			

Los parámetros estadísticos de los coeficientes de la regresión se resumen en la Tabla 3-4 y el análisis de varianza en la Tabla 3-5. El modelo de regresión ponderada tiene una mejor bondad de ajuste con un  $R^2$  de 0.996 y la suma de los cuadrados es menor que para el modelo de regresión lineal, por lo que se concluye que el modelo ponderado es adecuado y satisfactorio para la predicción de concentraciones.

**Tabla 3-5** Parámetros para los modelos de regresión lineal simple y ponderada

<b>Modelo</b>	<b>Parámetros</b>	<b>Coeficientes</b>	<b>Error típico</b>	<b>Estadístico t</b>	<b>Probabilidad</b>
<b>RLS</b>	Intercepto (a)	-0.0427	0.0082	-5.2275	0.000163103
	Pendiente (b)	0.0241	0.0004	56.6879	5.90537E-17
<b>RLW</b>	Intercepción ( $a_w$ )	-0.019903	1.799E-17	-1.10649E+15	1.0137E-189
	Pendiente ( $b_w$ )	0.021438	9.378E-19	2.28596E+16	8.1164E-207

Los límites de detección y cuantificación se obtienen a partir de los valores de absorción obtenidos para nueve blancos de la mezcla digestora (Tabla 3-6), a los que se les realizó todo el procedimiento descrito en el protocolo. El cálculo se realizó de acuerdo con las Ec. 3.1, 3.2 y los parámetros  $b_w$  y  $a_w$  de la ecuación de la recta ponderada. Se hace uso del criterio de límites con el fin de tener control analítico sobre muestras en las que usualmente no se espera contenido de Cr. Los límites de detección y cuantificación estimados fueron de 2.9 mgCr/kg y el de cuantificación en 3.6 mgCr/kg, respectivamente.

Con esto, se establece finalmente el rango de cuantificación para un 95% de confianza entre 3.6 y 30 mgCr/kg tanto en muestras de heces como de alimentos que sirven de vehículo para la dosificación del marcador.

**Tabla 3-6** Señales del blanco ( $y_0$ ) para estimación de LOD y LOQ de Cr mediante Uv-vis

Nº Lecturas	Señal del blanco ( $y_0$ )
1	0.034
2	0.033
3	0.032
4	0.039
5	0.035
6	0.035
7	0.032
8	0.033
9	0.038
$\bar{y}_0$	0.035
$S_{y0}$	0.003
$y_0 + 3S_{y0}$	0.042
$y_0 + 10S_{y0}$	0.060

### 3.5.3 Precisión intermedia

Se evaluó la precisión intermedia entre días, analistas y en tres niveles de concentración correspondientes al 80, 100 y 120% del valor esperado en las muestras de ensayo; esto es, en 12,15 y 18 mg/kg que constituye el radio de concentraciones para Cr esperado en heces bovinas provenientes de animales que han sido dosificados con cantidades de marcador entre 10 y 20 g  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ /día de acuerdo a lo encontrado en la literatura (Sampaio et al., 2011). Los resultados de la evaluación de este parámetro se encuentran en la tabla 3-7.

Se encontró que, para el rango de niveles evaluado, tanto la repetibilidad como la reproducibilidad entre días y concentraciones fueron aceptables con un RSD global de 3.63%, cumpliendo con el criterio de aceptación y por ende el método se considera preciso.

**Tabla 3-7** Evaluación de la precisión intermedia en la determinación de Cr mediante Uv-vis.

PRECISIÓN INTERMEDIA				
	Concentración de referencia (Cr mg/kg)	Concentración calculada		
		12.00	15.00	18.00
Analista 1	Dia 1	12.25	15.44	17.63
		11.71	15.31	17.76
	Dia 2	12.58	15.98	17.92
		12.79	16.39	18.38
	Dia 3	12.29	16.14	17.67
		12.17	16.02	18.21
	Dia 4	11.30	15.07	17.18
		11.46	15.56	17.43
	Dia 5	11.63	14.82	17.22
		11.67	15.52	17.38
Analista 2	Dia 1	11.96	14.94	18.59
		10.84	15.19	17.84
	Dia 2	12.91	15.73	18.34
		12.79	16.14	18.59
	Dia 3	12.33	15.52	18.75
		13.28	15.98	18.46
	Dia 4	11.96	14.65	17.51
		12.41	15.69	17.59
	Dia 5	12.41	15.31	17.72
		12.21	14.86	18.01
$\bar{X}$		12.15	15.51	17.91
S		0.58	0.48	0.47
% RSD		4.79	3.12	2.62
% RSD Global			3.63	

### 3.5.4 Exactitud

Se evaluó la exactitud como porcentaje de recuperación de Cr en el material de referencia con una concentración nominal promedio de 15.83 mg Cr/kg para tres muestras fabricadas de manera individual y analizadas por duplicado. Se calculó la concentración de Cr recuperado usando el modelo de regresión ponderado y se halló el porcentaje de recuperación de acuerdo con la ecuación 3.3. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3-8. Dado que el material de referencia se fabricó de manera individual y las varianzas son desiguales entre muestras ( $p < 0.05$ ), se procedió a compararlas mediante una prueba  $t$ , tomando como hipótesis nula que la diferencia entre las medias es cero para un nivel de confianza del 95%. El estadístico calculado ( $t = 0.9656$ ) es menor al crítico ( $t_{0.95} = 1.94318$ ) con  $p = 0.1858$ , por lo que se aceptó la hipótesis nula y se concluye que no hay diferencia entre las medias de la concentración de referencia y la concentración calculada, en consecuencia, el método se considera exacto.

**Tabla 3-8** Análisis de exactitud en la determinación de Cr mediante Uv-vis.

	Concentración de referencia (mg Cr /kg)	Concentración Calculada (mg Cr /kg)	Porcentaje de recuperación (%)	Error (%)
	15.73	15.70	99.81	0.19
	15.73	15.74	100.04	0.04
	16.33	15.58	95.37	4.63
	16.33	15.72	96.26	3.74
	15.43	15.45	100.10	0.10
	15.43	15.79	102.34	2.34
<b>Media</b>	15.83	15.66	98.99	1.84
<b>Varianza</b>	0.17	0.02		

El porcentaje de recuperación es de  $98.99\% \pm 2.11\%$ , es decir que todos los valores se encuentran dentro del rango esperado y la recuperación cumple el criterio de aceptación fijado con un error inferior al 2%.

### 3.5.5 Estabilidad

La estabilidad del complejo coloreado se evaluó por triplicado sobre los valores de absorción para soluciones preparadas de manera independiente a partir de heces enriquecidas con 15 y 25 mgCr/kg, durante un periodo de 180 días con el fin de evaluar el tiempo de vida útil de las muestras una vez procesadas (Tabla 3-9). Las soluciones se almacenaron en frascos Schott ámbar con tapa refrigerados a 4°C y sin incidencia de luz. Se realizaron mediciones sobre las soluciones a temperatura ambiente (23°C en promedio) en los días 1, 30, 60 y 180. Se evaluó si había diferencia significativa en la absorción a través del tiempo con un test de comparaciones múltiples HSD de Tuckey para un nivel de significancia de 95%. Los errores estándar (*RSE*) para los niveles 1 y 2 de concentración fueron 0.0082 y 0.0053 respectivamente. No se encontró diferencia estadística entre la absorción del día de preparación de la muestra y las demás mediciones durante el periodo de tiempo evaluado (Tabla 3-10).

**Tabla 3-9** Evaluación de estabilidad del color en el tiempo.

Dia	Absorción	
	Nivel 1 (15mgCr/kg)	Nivel 2 (25mgCr/kg)
1	0.328	0.571
	0.321	0.561
	0.324	0.572
30	0.327	0.569
	0.323	0.563
	0.321	0.566
60	0.328	0.573
	0.326	0.575
	0.324	0.583
180	0.329	0.570
	0.324	0.581

0.300

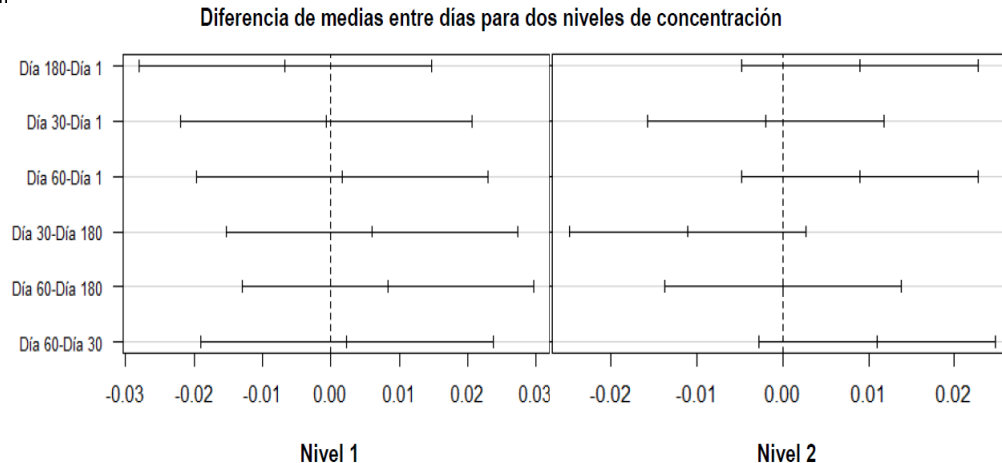
0.580

Todos los valores de  $p$  entre los periodos de evaluación indican que la absorción no cambia significativamente con el tiempo ( $p > 0.05$ ), sin embargo, cuando se observa la distribución de la varianza (Figura 3-4), se encuentra que para el nivel correspondiente al *target* de las muestras (15 mgCr/kg), las diferencias entre los grupos de días de almacenamiento tienen radios de variación menores que para el nivel de mayor concentración (25 mgCr/kg). En el primer nivel, la diferencia entre la señal obtenida el primer mes y el segundo es muy cercana, mientras que para el segundo nivel la variación se observan radios menos cercanos al valor central de diferencia nula, pero en un rango más cerrado.

**Tabla 3-8** Análisis de varianza para la estabilidad del color en el tiempo

	Nivel 1		Nivel 2	
Días de almacenamiento	p value	Diferencia	p value	Diferencia
180-1	0.75	-0.007	0.23	0.009
30-1	1.00	-0.001	0.96	-0.002
60-1	0.99	0.002	0.23	0.009
30-180	0.80	0.006	0.12	-0.011
60-180	0.61	0.008	1.00	0.000
60-30	0.98	0.002	0.12	0.011

**Figura 3-4** Radios de diferencia de medias para el test de Tuckey con nivel de significancia  $\alpha < 0.05$



Dado que no hay varianza significativa en los periodos de almacenamiento, pero se observa la tendencia de aumento de la variación de la señal con el tiempo, para establecer el criterio de estabilidad se toma como referencia los valores de radios menores del primer nivel de concentración debido a que éste corresponde al valor central esperado en las muestras. Bajo este criterio se fija para el método un almacenamiento máximo de hasta 60 días en las condiciones previamente señaladas.

### **3.6 Conclusiones**

El trabajo de validación mostró que el método colorimétrico para el análisis de cromo en heces bovinas y alimentos que sirven de vehículo para la dosificación del marcador presenta un buen performance dentro del rango de concentraciones estudiado, de manera que es selectivo en la matriz de estudio y no presenta interferencias importantes que puedan incidir en la recuperación del analito. Así, el alcance del método en la estimación de producción de heces con el uso del marcador de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  individual, se extiende a muestras con contenido  $\text{TiO}_2$ , por lo que se convierte en una herramienta confiable cuando se requiere evaluar ambos marcadores simultáneamente. El análisis de interferencias muestra que el método es selectivo para Cr, incluso en presencia de Ti y no se encontró ninguna otra señal que pudiese estar asociada a la presencia de otros compuestos inorgánicos que puedan estar en solución.

Así mismo, se comprueba que la linealidad del método es buena y los intervalos de confianza ofrecen una bondad de ajuste satisfactoria. Los límites de detección son adecuados para trabajo en bajos niveles de concentración. Esto permite que el método sea aplicable en muestras de heces de bovinos que hayan sido tratados previamente con dosificación de marcadores para estudios de digestibilidad ya que se puede determinar la cantidad de cromo basal remanente de manera que, en el momento de realizar las estimaciones concernientes a producción de heces, este no sea un factor que imprima variabilidad o sobrestimación del marcador. Por otro lado, resulta un método preciso y



exacto con niveles de confianza por encima del 95% para todos los parámetros, siendo repetible y reproducible. El estudio de estabilidad muestra que la formación del compuesto coloreado se mantiene en la solución de trabajo sin cambios en la absorción hasta por seis meses. En este punto, es de notar que, a pesar de no encontrar significancia entre las medias, el análisis de diferencia en la señal del primer día de ensayo frente a periodos superiores a 60 días muestra que para los niveles de absorción alrededor del límite superior de cuantificación la variación en el tiempo es ligeramente mayor. Dado que este aumento no puede ser asociado a errores aleatorios sin un estudio más profundo, es recomendable que las muestras no sean almacenadas por periodos superiores a 60 días con el fin de asegurar la calidad analítica de los resultados.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de validación indican que el método es satisfactorio para el alcance propuesto y por ende ofrece una alternativa confiable para la estimación de marcadores en estudios de digestibilidad de rumiantes, cumpliendo con el alcance propuesto.

### 3.7 Bibliografía

- AOAC. (2013). Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals. AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) *Official Methods of Analysis*, 1–32.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (1980). *AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 1)* (Vol. 1).
- Cabral, Í. D. S., Azevêdo, J. A. G., Dos Santos Pina, D., Pereira, L. G. R., De Almeida, F. M., Souza, L. L., & De Lima, R. F. (2017). Evaluation of internal markers as determinants of fecal dry matter output and digestibility in feedlot sheep. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(5), 3331–3339. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3331>
- Carruthers, V. R., & Bryant, A. M. (1983). Evaluation of the use of chromic oxide to estimate the feed intake of dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 26(2), 183–186. <https://doi.org/10.1080/00288233.1983.10427057>
- Czarnocki. (1960). The determination of chromic oxide in samples of feed and excreta by acid digestion and spectrophotometry. *Can. J. Anim. Sci.*, 167–179.
- Czerkawski, J. W., & Breckenridge, G. (1977). Design and development of a long-term

- rumen simulation technique (Rusitec). *The British Journal of Nutrition*, 38(3), 371–384. <https://doi.org/10.1079/BJN19770102>
- Fenton, T. ., & Fenton, M. (1979). An Improved Procedure For The Determination Of Chromic Oxide In Feed And Feces. *Canadian Journal of Animal Science*, 63, 631–634. <https://doi.org/10.4141/cjas79-081>
- Haney, J. T., Erraguntla, N., Sielken, R. L., & Valdez-Flores, C. (2014). Development of an inhalation unit risk factor for hexavalent chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(2), 201–211. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.12.005>
- Ich. (2005). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *International Conference on Harmonization*, 1994(November 1996), 17. Retrieved from <http://www.ich.org/>
- Icontec. (2005). Norma Técnica Colombiana NTC-ISO / IEC 17025. In *Norma Técnica Colombiana* (p. 49). Retrieved from [https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC\\_17025-2005.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/red-nal-laboratorios/resoluciones/NTC-ISO-IEC_17025-2005.pdf)
- Juan, P., Josep, E., & Samuel, C. (2015). Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. In *Analytical Separation Science* (1757–1808). American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep064>
- Kimura, F. T., & Miller, V. L. (1957). Chromic Oxide Measurement, Improved Determination of Chromic Oxide in Cow Feed and Feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5(3), 216. <https://doi.org/10.1021/jf60073a008>
- Kort, E. a., Andrews, A. E., Dlugokencky, E., Sweeney, C., Hirsch, A., Eluszkiewicz, J., ... Wofsy, S. C. (2010). Atmospheric constraints on 2004 emissions of methane and nitrous oxide in North America from atmospheric measurements and a receptor-oriented modeling framework. *Journal of Integrative Environmental Sciences*, 7(sup1), 125–133. <https://doi.org/10.1080/19438151003767483>
- Miller, J. N., Miller, J. C., Jiménez, C. M., & Hornillos, R. I. (2008). Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid: Pearson Prentice-Hall.
- Latimer, G. W., & AOAC International. (2012). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Appendix F, pages 1-17. Retrieved from [www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
- Whitby, L. G., & Lang, D. (1960). Experience with the chromic oxide method of fecal marking in metabolic balance investigations on humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 39(1), 854–863. <https://doi.org/10.1172/JC1104106>

## 4. Implementación del método colorimétrico en la técnica del marcador externo en un sistema tradicional de pastoreo

### 4.1 Resumen

Se realizó un experimento de consumo de kikuyo (*Cenchrus Clandestinus*) en un sistema tradicional de pastoreo con ofertas de entre 2.6 y 4.0 kg MS/100 kgPV por animal y suplementación de dos concentrados comerciales con torta de soya y torta de higuierilla en porciones de 8 kg/día. Los animales utilizados en el estudio fueron ocho vacas multíparas de raza Holstein, mantenidas bajo pastoreo libre, en pasturas con 35 días de rebrote y consumo de agua y sal *ad libitum*. A los animales se les asignó aleatoriamente los concentrados en un diseño *cross-over*. Con el suplemento suministrado, se dosificaron 20 g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  vehiculizados en pellets y ofertados durante el ordeño en dos porciones de 10 g cada una y a lo largo de dos periodos de treinta días cada uno. Por cada periodo, se establecieron 23 días de adaptación y 7 de medición, en los que se tomaron muestras *in situ* de heces para el análisis de marcadores externos e internos. Se determinó el contenido de marcadores internos FDAi, FDNi y MSi para muestras de heces y alimentos, y el contenido de marcador externo usando tres métodos de cuantificación de Cr: el método de Fenton y Fenton (A), el método optimizado (B) y el método de referencia (C). Se encontró correlación y concordancia entre los resultados obtenidos mediante los métodos B y C con una diferencia crítica de medias de 0.3258, por lo que se calculó la producción de heces individual con estos datos, encontrando que no hay diferencia significativa al aplicar ambos métodos ( $p>0.05$ ), mientras que el método A no tiene correlación con el método de referencia y subestima los valores de Cr, resultando en sobreestimaciones de producción de heces (PH). Con esto se demuestra

que el método desarrollado y validado analíticamente (B), es satisfactorio para la cuantificación de Cr frente a un método de referencia en la estimación de la producción de heces. Se utilizaron las ecuaciones de Detmman y Correa (Correa, et al., 2009; Detmann et al., 2001) para estimar el consumo individual de forraje encontrando diferencias significativas entre los valores obtenidos para este parámetro con los diferentes algoritmos. El promedio de datos para consumo encontrado con los datos de PH obtenidos por los métodos B y C, resultó menor que lo reportado en la literatura para este tipo de forrajes, pero no hay diferencia en el promedio global calculado con los algoritmos evaluados. Con este trabajo se encontró que el marcador interno con el que se reportan valores más altos de consumo es la MSi pero que el que entrega valores más confiables respecto a valores de referencia para el forraje estudiado es el FDNi.

## 4.2 Introducción

En la actualidad existen una gran cantidad de técnicas para la determinación de ingesta de forraje en rumiantes bajo condiciones de pastoreo y escoger la más adecuada depende básicamente de los recursos disponibles tanto en campo como en laboratorio para realizar estimaciones de alta precisión. Una de las técnicas más generalizadas es la determinación del consumo de forraje individual a partir de la digestibilidad del forraje y de la producción de heces (PH). Este último parámetro se puede estimar de manera directa con la recolección total de la materia fecal o mediante el uso de marcadores (Detmann et al., 2001), que es la forma que presenta menor dificultad ya que se evita la recolección total. Dentro de los marcadores más utilizados para este fin se encuentran diversos óxidos de metales indigestibles sin efecto sobre la digestión, siendo el óxido de cromo el más ampliamente reportado debido a que se ha probado su comportamiento cíclico en el tracto digestivo y su inocuidad para el ecosistema ruminal (Lachmann & Febres, 1999, Alami et al., 2014), así como una baja absorción en el tracto intestinal (EPA, 1998), haciéndolo ideal como marcador externo.

Aunque se ha cuestionado el uso de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  debido a la alta carcinogenicidad de los subproductos generados durante los análisis de laboratorio, la principal limitación para la implementación de otros marcadores en las estimaciones de consumo radica en la falta de estudios en condiciones tropicales (Sampaio et al, 2011) y a la accesibilidad a análisis de laboratorio que implican técnicas de absorción atómica (FAAS) o de espectrometría de masas con plasma acoplado (ICP-MS). Al contar con un método alternativo de cuantificación de Cr por espectrofotometría visible, de alta precisión, exactitud y confiabilidad en la determinación del marcador en la muestra, se asegura que la variabilidad de las estimaciones no se va a afectar por el método y así, el *performance* de los resultados obtenidos en pruebas reales de campo va a estar determinado por la elección del marcador interno más adecuado para la estimación de consumo de acuerdo a las condiciones de cada ensayo (Cabral et al., 2017; Lippke, 2002; Sampaio et al., 2011).

Por tal razón, el objetivo de este capítulo es implementar el método colorimétrico para cuantificación de Cr en la estimación de producción de heces y reporte de consumo voluntario bajo pastoreo de bovinos suplementados con concentrados comerciales de soya e higuierilla con el fin de evaluar el alcance del método, su pertinencia frente a los resultados obtenidos con un método de referencia y establecer criterios estadísticos en la búsqueda del marcador interno más adecuado para el reporte de consumo de kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) en animales suplementados.

## 4.3 Materiales y métodos

### 4.3.1 Animales y dosificación del marcador

Para el ensayo de estimación de producción de heces y consumo voluntario de forraje, se utilizaron muestras de heces fecales recolectadas *in situ* de ocho vacas Holstein multíparas con periodos de lactancia variables, y promedio de peso vivo de  $653 \pm 71.2$  kg que se mantuvieron bajo condiciones de pastoreo con consumo *ad libitum* de agua, sal

mineralizada y pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) con días de rebrote entre 32 y 40 días y ofertas entre 2.6 y 4 kg MS/100 kg PV . El experimento se llevó a cabo en la estación agraria “Paysandú” con las condiciones ambientales y geográficas descritas en el numeral 3.3.1 de este trabajo. El marcador externo fue suministrado durante los periodos de ordeño en dos dosis diarias de aproximadamente 10 g de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  cada una usando como vehículo dos tipos de concentrados comerciales con la formulación isoprotéica e isoenergética usada por Ramírez (2017). La dosificación se realizó durante dos periodos de treinta días.

Por cada animal, se tomaron muestras de heces control ( $H_0$ ) previo al suministro del marcador. El periodo de experimentación fue de 23 días de adaptación a la dieta con el marcador y 7 días de medición, etapa en la que se realizó la recolección de muestras. El muestreo se realizó según el procedimiento descrito por Correa et al (2009). Se siguieron todos los protocolos para el uso de animales experimentales según reglamentación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (Acta 03 del 15 de marzo del 2010).

#### 4.3.2 Métodos

La colecta de forraje para la determinación de factores de indigestibilidad se hizo usando el método *Hand Pluck* durante los días de medición simulando el pastoreo selectivo de los animales de Euclides (Aroeira et al., 2001). Las muestras fueron secadas a 60 °C durante 48 h en estufa de aire forzado y molidas en molino de cuchillas Fritsch Idar Oberstein® con criba de 1 mm y tamizadas en malla N°18 ASTM.

Para establecer los factores de indigestibilidad, se utilizaron tres marcadores internos, fibra en detergente neutro (FDNi), fibra en detergente ácido indigestibles (FDAi) y materia seca indigestible (MSi). Para ello se tomó aproximadamente 1 g de cada muestra (heces, forrajes y suplementos) en bolsas ANKOM F57 de 25 µm de poro y se llevaron a incubación ruminal *in vitro* por 144 h en una incubadora Daisy II a 39°C con licor ruminal proveniente de tres vacas Holstein canuladas al rumen pastando el mismo forraje que los

animales dosificados con marcador. Como mezcla de medio de cultivo se utilizó la composición propuesta para incubaciones ruminales *in vitro* sin tripticasa, en proporción 4:1 (Theodorou et al., 1994). Transcurrido el tiempo de incubación, las bolsas con las muestras fueron sometidas a lavado automático de forma homogénea y secadas durante 48 h a 60 °C en estufa convectiva. Posteriormente, se realizó el análisis de fibras en detergentes neutro y ácido siguiendo el método secuencial de Van Soest (1994) con un analizador de fibras Ankom 200®.

El reporte de producción de heces (PH), consumo de materia seca de forraje (CMSf) y de suplemento (CMSs) se realizó usando las ecuaciones de Carulla y Detmann asumiendo el porcentaje de recuperación reportado por Correa et al., (2009b). La determinación del marcador externo en heces y concentrados se realizó con los tres métodos de cuantificación de Cr, que son el original de Fenton & Fenton (A), el método modificado propuesto en el Capítulo 2 (B) y un método de referencia (C) por espectrofotometría de absorción atómica FASS (Correa et al., 2009c).

## 4.4 Resultados y discusión

### 4.4.1 Correlación y concordancia de los métodos

Todas las muestras obtenidas para cada animal en los dos periodos de experimentación fueron analizadas por los métodos de cuantificación de cromo descritos como A, B y C. Los valores se reportan como el promedio del porcentaje de Cr obtenido para tres réplicas de cada una de las muestras (Tabla 4-1). Para la comparación metodológica, el efecto intra-sujeto no es tenido en cuenta, así como el efecto de las repeticiones en el tiempo debido a que no se busca eliminar la varianza del error. Con el fin de estimar la diferencia entre los métodos y contrastar los resultados obtenidos, se realiza inicialmente un contraste *t* para datos emparejados en donde se hipotetiza que no hay diferencia entre los métodos, por ende, la diferencia de medias entre cada pareja de datos es  $\mu_d = 0$  y el estadístico de prueba es:

$$t = \bar{d}\sqrt{n}/S_d \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Con  $n-1$  grados de libertad para  $t$  y con  $\bar{d}$  como la media de las diferencias con desviación estándar  $S_d$ , se obtiene un  $t_{crit} = 1.7531$

**Tabla 4-1** Porcentaje de Cr total obtenido por cada uno de los métodos

Animal	% Cr en las muestras		
	Método Original (A)	Método optimizado (B)	Método FAAS (C)
1	0.116	0.170	0.170
1	0.115	0.169	0.160
2	0.119	0.141	0.140
2	0.125	0.160	0.150
3	0.107	0.149	0.140
3	0.124	0.163	0.140
4	0.114	0.155	0.160
4	0.114	0.169	0.170
5	0.129	0.178	0.170
5	0.106	0.170	0.170
6	0.113	0.145	0.120
6	0.113	0.156	0.150
7	0.110	0.137	0.130
7	0.110	0.160	0.150
8	0.118	0.152	0.130
8	0.162	0.190	0.180
<b>Media</b>	0.118	0.160	0.152
<b>Varianza</b>	0.013	0.014	0.018

El contraste por parejas requiere que las diferencias tengan distribución normal, por lo que se inspeccionan con un test de Shapiro-Wilk que confirma la normalidad entre las diferencias de los métodos. En la Tabla 4-2 se resumen los estadísticos para la prueba de contraste. Se observa que, para los tres casos, la diferencia es significativa y por ende los métodos difieren entre sí. Sin embargo, el coeficiente de Pearson entre los métodos B-C muestra que hay correlación entre ellos y se espera que estos son comparables. Dado que el contraste  $t$  resulta no ser adecuado, es necesario contar con un criterio adicional tal que se pueda decidir si el método establecido es concordante con el de

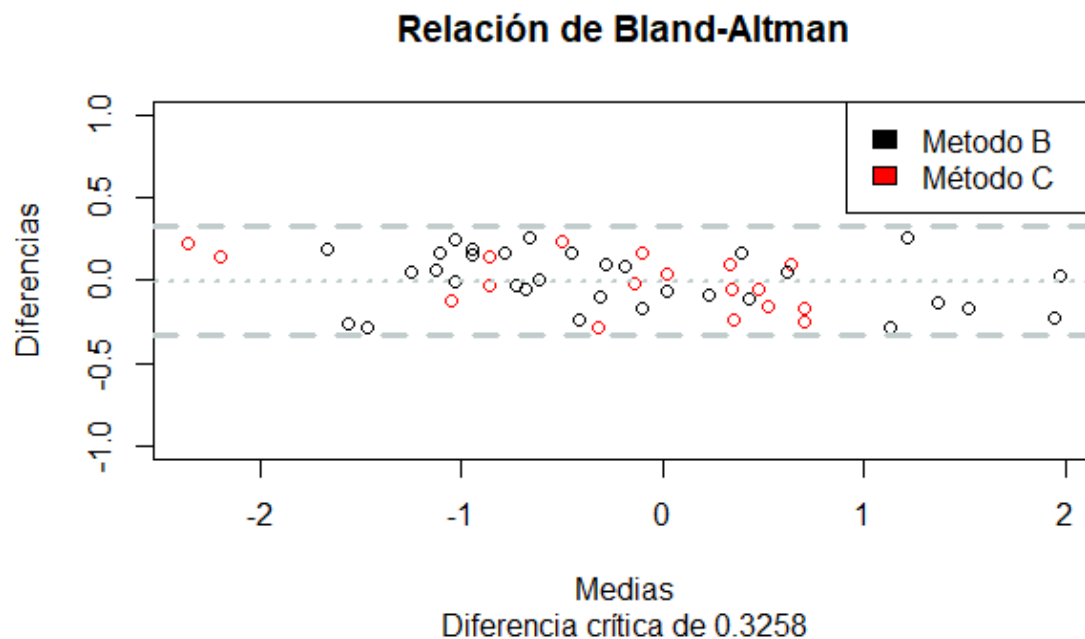


referencia. Para ello se usa la prueba de Bland-Altman (Bland & Altman, 2007) con el fin de cuantificar la diferencia media entre los métodos o el *bias*, con un rango de confianza del 95%. Se determinan las variabilidades entre los datos individuales y se usa como criterio para establecer que los métodos pueden usarse indistintamente para la cuantificación de Cr en las muestras. Todos los análisis estadísticos se hicieron usando el programa *RStudio* y el paquete *BlandAltmanLeh* (Lehnert, 2015) siguiendo la metodología descrita por Martínez (2017).

**Tabla 4-2** Parámetros del análisis de contraste para datos emparejados

Estadísticos de contraste	A-B	B-C	A-C
Coeficiente de correlación de Pearson	0.6360	0.8693	0.4200
Estadístico t	14.3541	3.8230	7.8511
P(T<=t) una cola	1.804E-10	0.0008315	5.422E-07
Estadístico W	0.98669	0.94545	0.98576
P(>0.05)	0.8412	0.02226	0.80

Con el fin de observar si los datos de ambos métodos se encuentran entre los intervalos de confianza establecidos, se representan las diferencias entre los valores emparejados por los métodos B-C y el valor de sus medias como estimador del valor real de la variable en el gráfico de Bland-Altman (Figura 4-1). La diferencia media refleja el error sistemático contra la precisión (SD y CI) que refleja el error aleatorio. Se toma como hipótesis que si los valores son similares la diferencia media se sitúa en cero. El coeficiente de correlación de Pearson por el método de Bland-Altman indica que hay correlación positiva entre los valores obtenidos a través de los métodos B y C ( $r = 0.9847$ , 95% CI = 0.9732- 0.9914,  $p < 0.001$ ,  $t = 39.279$ ).

**Figura 4-1** Gráfico de medias y diferencias Bland-Altman

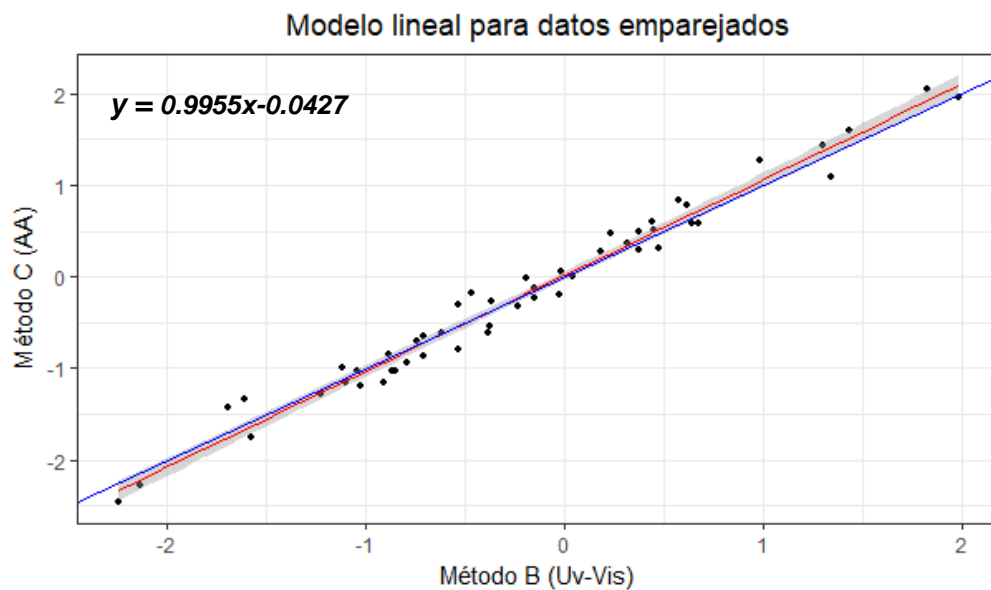
Puesto que la alta correlación no implica concordancia entre los métodos, se evalúa esta última con una prueba de linealidad con el fin de estimar la concordancia en términos de los parámetros de la regresión. El criterio para definir si hay concordancia es que la pendiente del modelo de regresión sea 1. Valores menores de la pendiente indican que el método B subestima al método C y valores mayores implican sobrestimación (Figura 4-2). Los parámetros de la regresión se registran en la Tabla 4-3. Se encuentra que la pendiente de la regresión no es significativamente diferente de 1, por lo que se deduce que los métodos tienen concordancia sin que haya sub o sobrestimación.

**Tabla 4-3** Parámetros de la regresión de Bland-Altman

Residuals	Min	1Q	Median	3Q	Max
Residuals	-0.268178	-0.135277	-0.005666	0.139153	0.292898
Residual standard error: 0.1551 on 48 degrees of freedom					

**Tabla 4-4** (Continuación)

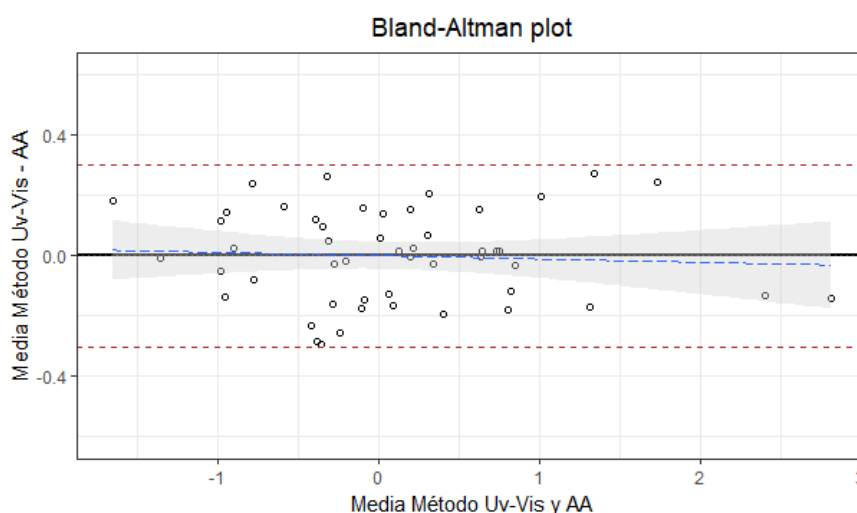
Coefficients	Estimate	Std. Error	t	Pr(> t )
(Intercept)	0.003758	0.022068	0.17	0.865
Slope	0.995555	0.025346	39.28	<2e-16
Multiple R-squared: 0.9698				
F-statistic: 1543 on 1 and 48 DF, p-value: < 2.2e-16				
Resumen	Unidad	Límite inferior	Límite superior	
SD	0.1662			
Mean B	0.0932			
Mean C	0.0965			
Bias	<b>-0.0033</b>	-0.3044	0.2977	
LoA sup (d+1.96SD)	0.3236	0.2461	0.4098	
LoA inf (d-1.96SD)	-0.3279	-0.4055	-0.2418	

**Figura 4-2** Estimación de la concordancia de datos emparejados

Por otro lado, cuando se analiza la relación de medias y la diferencia, se encuentra que el *bias* es sistemático y proporcional (Figura 4-3), sin tendencia y sobre la línea de cero,

con límites inferiores a  $\pm 0.05$ , lo que significa que la hipótesis es aceptable y se concluye que los métodos están correlacionados y los datos son concordantes entre sí con diferencia no significativamente diferente de cero.

**Figura 4-3** Bias de correlación y concordancia



Debido a que con frecuencia la evaluación de correlación entre métodos resulta ineficiente, se hace necesario aplicar herramientas de mayor capacidad que permitan establecer la concordancia entre datos cuando estos provienen de muestras con valores diferentes entre sí y de alta variación, pues los estadísticos de contraste apoyan su validez en el supuesto de que cualquier error, tanto aleatorio como sistemático, es independiente de la concentración, por lo que el método de Bland-Altman resulta apropiado como criterio. Así, es posible utilizar los valores obtenidos para la misma muestra con dos métodos diferentes en el cálculo de producción de heces y observar si el método validado cumple con el objetivo planteado.

Dado que la correlación entre el método original ( $r=0.42$ ) y el método de referencia es muy pobre, y teniendo en cuenta que las evidencias halladas durante su optimización indican que este presenta falencias en sensibilidad y linealidad, se desestima su pertinencia para el análisis de correlación y concordancia.

### 4.4.2 Producción de heces y consumo

Se realiza el cálculo de producción de heces (PH) usando la ecuación de Lippke (Ec. 4.2) y asumiendo el porcentaje de recuperación de 74.9% reportado en el trabajo de Correa (2009). Los datos de PH se registran en la tabla 4-4. Con el fin de estimar el consumo total individual, se usan los dos modelos de cálculo más comunes en la determinación de la digestibilidad a través del uso de marcadores internos.

$$PH_{(kgMS/día)} = \frac{Cr \text{ dosificado}}{Cr \text{ en heces}} \%R \quad (\text{Ec. 4.2})$$

**Tabla 4-5** Producción de heces obtenida con los tres métodos de cuantificación de Cr

PH (kgMS/día)			
Animal	Método A	Método B	Método C
1	5.04	3.44	3.55
1	5.14	3.50	3.81
2	4.89	4.13	4.30
2	4.70	3.67	4.06
3	5.42	3.91	4.28
3	4.71	3.59	4.32
4	5.08	3.75	3.75
4	5.17	3.49	3.59
5	4.50	3.25	3.51
5	5.51	3.46	3.56
6	5.17	4.02	5.01
6	5.19	3.76	4.03
7	5.31	4.24	4.63
7	5.37	3.69	4.06
8	4.90	3.81	4.60
8	3.62	3.09	3.37

Puesto que se estableció que los métodos B y C no presentan diferencias significativas, se pueden comparar los resultados finales para la producción de heces indistintamente teniendo en cuenta el sesgo calculado para las medias. Con esto, se realiza un contraste  $t$  para datos emparejados bajo la hipótesis de que la diferencia entre medias es 0.3258, que corresponde a la diferencia crítica obtenida mediante el análisis de correlación y concordancia en un nivel de confianza del 95%. Se encontró que no hay diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre la producción de heces calculada con los datos obtenidos a través de los dos métodos. Los parámetros estadísticos para la prueba de contraste se presentan en la Tabla 4-5.

**Tabla 4-6** Prueba  $t$  para medias de dos muestras emparejadas entre los métodos B-C

	<b>Método C</b>	<b>Método B</b>
Media	4.0269	3.6731
Varianza	0.2227	0.0952
Observaciones	16	16
Coeficiente de correlación de Pearson	0.8372	
Diferencia hipotética de las medias	<b>0.3258</b>	
Grados de libertad	15	
Estadístico $t$	0.4111	
$P(T \leq t)$ una cola	0.3434	
Valor crítico de $t$ (una cola)	1.7531	
$P(T \leq t)$ dos colas	<b>0.6868</b>	
Valor crítico de $t$ (dos colas)	2.1314	

Los consumos individuales de forraje por animal/día a partir de los valores de  $C_r$  recuperado en heces obtenidos por ambos métodos, se calcularon usando las ecuaciones de Detmann (Ec.4-3) y Correa (2009),

$$CMS_{kg/día} = \frac{Mih * PH - Mis}{Mif} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

$$CMS_{kg/día} = \frac{\left(Mih * \frac{PH}{0.8}\right) - Mis * CMSs}{Mif} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde  $M_{ih}$  corresponde al porcentaje de marcador indigerible en las heces,  $M_{is}$  al porcentaje de marcador indigerible en el suplemento y  $M_{if}$  el porcentaje de marcador indigerible del forraje. El resumen de los promedios se reporta en la Tabla 4-6.

Se encontró que, en promedio, el consumo obtenido con los métodos B y el C para los tres marcadores internos fue menor que para el método A, dado que este último subestima los valores de Cr al no ser completamente recuperado en heces alterando el resultado final. En promedio, los valores de consumo obtenidos con los cálculos de Detmann y Correa no presentan diferencia significativa entre sí. Cuando se comparan los datos entre los métodos B y C, independientemente del algoritmo, se encuentra que existe una diferencia promedio de 1 g MS/día en la estimación de la cantidad de forraje consumido independientemente del algoritmo. Para todos los casos, los valores de consumo promedio están por debajo del valor de referencia de 12 kgMS/día reportado por diferentes investigadores para el forraje evaluado (Valencia, 2013; García, 2013, Ramírez 2017). Sin embargo, es de anotar que el método de cuantificación para Cr usado en estos trabajos fue el de referencia (FASS) y FDAi como marcador indigestible, además de suplementos de diferente naturaleza, por lo que los valores de consumo no son comparables entre sí.

Puesto que los valores encontrados de consumo para ambos métodos están por debajo de los reportados en la literatura para este tipo de forrajes (Valencia, 2003), probablemente porque no se realizó corrección por blanco, es necesario aclarar que el método de referencia solo cuantifica concentraciones por encima de 10 mg Cr/kgMS, por ende, no es posible corregir el valor de cromo basal cuando se hace la comparación de métodos, lo que constituye un error sistemático en la medición. En general, cuando se comparan métodos validados en laboratorios de investigación con resultados obtenidos en laboratorios de referencia, es necesario que estos últimos tengan acreditación o que sean métodos validados con el fin de que la comparación sea más confiable. En este caso, la comparación entre el método validado para colorimetría frente al de referencia, presenta sesgo, y aunque son concordantes, la diferencia en los resultados de consumo es importante. Dado que no existen métodos normalizados para este tipo de análisis, se considera que la validación analítica completa del método colorimétrico es suficiente para establecer el aseguramiento de la calidad en los resultados obtenidos. Por otro lado, cuando se realizan ensayos con animales que han sido tratados en estudios previos con

marcadores externos, debe tenerse en cuenta la corrección basal, ya que en el tracto digestivo del animal y en las pasturas utilizadas por estos, se encuentran cantidades de Cr residual que pueden afectar la cuantificación (Sprinkle et al., 1995), por lo que se debe contar con un método cuyo límite de detección sea óptimo en muy bajas concentraciones.

**Tabla 4-7** Comparación de promedios de consumo individual obtenido entre marcadores internos para los métodos concordantes

	CMs kgMS/día			
	Detmann 2001		Correa 2009	
Msi	B	C	B	C
FDAi	9.7	10.7	9.5	10.8
FDNi	8.8	9.7	8.3	9.4
FDMSi	11.3	12.4	11.2	12.7

Finalmente, con el fin de implementar el método B observando la corrección de Cr basal de las heces el día cero, se realiza el ajuste encontrando valores más cercanos a lo reportado en la literatura para este tipo de forraje (García, 2013; Valencia, 2015). En todos los casos, se encuentra que el marcador interno usado es el principal factor de variación en el reporte de los datos de consumo para estudios en los que se realiza suministro de suplementos.

**Tabla 4-8** Consumo de forraje calculado a partir de los marcadores internos

Animal	Detmann 2001			Correa 2009		
	FDAi	FDNi	Msi	FDAi	FDNi	Msi
1	10.6	9.2	12.0	11.0	9.4	12.7
1	13.0	11.5	15.1	12.3	10.2	14.5
2	13.5	12.2	15.0	14.7	13.1	16.4
2	8.1	7.3	9.4	7.9	6.8	9.4



3	13.6	12.2	14.8	14.5	12.9	16.0
3	11.0	9.6	12.3	10.8	8.9	12.3
4	11.3	10.0	13.3	12.1	10.6	14.5
4	9.7	8.4	11.2	9.1	7.2	10.5
5	10.1	8.3	10.6	9.7	7.6	10.3
5	11.8	11.5	15.3	12.1	11.7	16.2
6	13.3	11.6	15.1	13.6	11.4	15.5
6	13.0	12.6	17.2	13.5	13.0	18.4
7	12.3	10.8	13.2	12.6	10.7	13.6
7	11.5	11.1	14.0	11.8	11.3	14.7
8	11.5	10.0	11.9	11.8	9.9	12.2
8	11.1	10.2	13.5	11.7	10.7	14.4
<b>Promedio</b>	11.6	10.4	13.4	11.8	10.3	13.9

La implementación del método colorimétrico para la estimación de consumo bajo pastoreo en animales suplementados resulta ser satisfactoria frente al método de referencia. Se observa que las diferencias principales no están ligadas al método de cuantificación del marcador ni al modelo de cálculo para consumo de forraje sino a los parámetros de digestibilidad que en él intervienen. Es de resaltar que la ecuación de Carulla, reportada por Correa, tiene en cuenta un porcentaje de recuperación del marcador interno y la cantidad de suplemento ofrecido, factores que no son tenidos en cuenta por Detmann pero que, en términos generales, no presenta diferencias. Con el método colorimétrico, se mejora además el límite de detección frente al método de referencia, lo que permite tener cuantificaciones más precisas de la PH al permitir realizar la corrección de Cr basal en animales experimentales que han sido utilizados para ensayos previos con marcadores y cuyas heces presentan cantidades importantes de Cr residual proveniente de tratamientos previos; como consecuencia, el método ofrece más confiabilidad en el cálculo de consumo. Los consumos reportados usando el MSi fueron los más altos, con promedios de 13.4 y 13.9 kgMS/día calculados con ambos algoritmos.

Algunos autores coinciden en que los mejores marcadores internos son el FDNi y el FDAi (Detmann et al., 2007; Sampaio et al., 2011b; Ferreira et al., 2009) mientras que otros trabajos han encontrado mejores resultados con DMSi, MSi o alcanos (Cabral et al., 2011, Heilburger, 2017; Heublein et al., 2017), sin que se haya llegado aún consenso para este parámetro, por lo que la elección va a depender de los recursos de cada

laboratorio, de la estandarización de las técnicas mediante las cuales se obtiene el marcador interno y de la composición de la dieta de los animales (Sampaio et al, 2011) Para este trabajo, el marcador interno que entregó los resultados de CMSf más altos fue el MSi, probablemente porque su obtención implica un procedimiento más sencillo, reduciendo la propagación del error en las medidas. Sin embargo, una elección apropiada del marcador interno debe estar basada en la comparación metodológica y en la determinación del error en los valores de recuperación de dichos marcadores en las heces.

## 4.5 Conclusiones

El método colorimétrico cumple con su alcance y ofrece una varianza entre muestras emparejadas menor que el método de referencia. Sin embargo, cuando se hacen este tipo de comparaciones, es necesario tener en cuenta la variabilidad que existe entre muestras debido a las diferentes concentraciones y definir si existe sesgo en los métodos. Es posible que esta diferencia se deba a que el método de referencia usado está concebido para análisis en alimentos y en su alcance no se contemplan muestras fecales a pesar de que normalmente es aceptado su uso para este fin.

La implementación del método colorimétrico resulta entonces adecuada para la estimación de consumo de forrajes bajo condiciones de pastoreo, ya que ofrece buena recuperación del marcador en heces, gran precisión y exactitud en los resultados, y que, al ser usados para el cálculo PH, entrega valores concordantes para la estimación de consumo promedio, siendo el uso de los diferentes marcadores internos, lo que imprime variabilidad en los valores finales de CMSf. Puesto que para estimar consumo es indispensable usar marcadores internos, se hace necesario verificar que los métodos de cuantificación de éstos ofrezcan veracidad y precisión con el fin de minimizar el error en las estimaciones.

## 4.6 Bibliografía

- Alami, A. Al, Gimeno, A., de Vega, A., Fondevila, M., & Castrillo, C. (2014). Effects of Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> labelling dose, and of faeces sampling schedule, on faecal Cr concentration and on digestibility estimation in cattle fed high-concentrate diets. *Livestock Science*, 168, 53–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.07.017>
- Aroeira, L. J. M., Lopes, F. C. F., Soares, J. P. G., Deresz, F., Vemeque, R. D. S., Arcuri, P. B., & Lopes De Matos, L. (2001). Daily intake of lactating crossbred cows grazing elephant grass rotationally. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 36(6), 911–917. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000600009>
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (2007). Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 17(4), 571–582. <https://doi.org/10.1080/10543400701329422>
- Cabral, Í. D. S., Azevêdo, J. A. G., Dos Santos Pina, D., Pereira, L. G. R., De Almeida, F. M., Souza, L. L., & De Lima, R. F. (2017). Evaluation of internal markers as determinants of fecal dry matter output and digestibility in feedlot sheep. *Semina:Ciencias Agrarias*, 38(5), 3331–3339. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n5p3331>
- Correa, H., Pabón, M., & Carulla, J. (2009). Estimation of dry matter intake of lactating Holstein cows under grazing in Antioquia. *Página 1 de 12 Estimación del consumo de materia seca en vacas Holstein bajo pastoreo en el trópico alto de Antioquia Estimation of dry matter intake of lactating Holste. Livestock Research For Rural Development*, 21(4), 1–12.
- Detmann, E., Paulino, M. F., Zervoudakis, J. T., Valadares Filho, S. de C., Euclides, R. F., Lana, R. de P., & Queiroz, D. S. de. (2001). Cromo e indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(5), 1600–1609. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000600030>
- Fenton, T. ., & Fenton, M. (1979). An Improved Procedure For The Determination Of Chromic Oxide In Feed And Feces. *Canadian Journal of Animal Science*, 63, 631–634. <https://doi.org/10.4141/cjas79-081>
- Garcia, W. (2013). *Potencial de la suplementación con biomasa obtenida a partir de la producción de bioetanol en ganaderías de clima frío dedicadas a la producción de leche*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/11696/1/98669231.2013.pdf>
- Gil Martínez, C. (2017). ANÁLISIS GRÁFICO DE BLAND-ALTMAN. Retrieved from [https://rpubs.com/Cristina\\_Gil/B-A\\_analysis](https://rpubs.com/Cristina_Gil/B-A_analysis)
- Grevatt, P. . (2010). Toxicological Review of. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 39(110), 759–786. <https://doi.org/http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0070tr.pdf>

- Hammeleers, A. (2018). Métodos para estimar el consumo voluntario de forrajes por ruminantes en pastoreo, Retrieved from <http://prodanimal.fagro.edu.uy>.
- Heublein, C., Südekum, K.-H., Gill, F. L., Dohme-Meier, F., & Schori, F. (2017). Using plant wax markers to estimate the diet composition of grazing Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 1019–1036. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-11494>
- Lachmann, M., & Febres, O. (1999). La estimación de la digestibilidad en ensayos con rumiantes. *Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias ....* Retrieved from <http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/Digestibilidadderumiantes.pdf>
- Lippke, H. (2002). Estimation of forage intake by ruminants on pasture. *Crop Science*, 42(3), 869–872. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.8690>
- Mayorga Mogollón, O. L. (2011). Evaluación de sistemas de alimentación en vacas Holstein y su efecto sobre la productividad animal, la emisión de metano y de óxido nitroso y la captura de carbono en la Sabana de Bogotá, 1–76.
- Ramírez, C., & Giraldo, L. . (2017). Evaluation of dietary supplements containing castor cake on in situ degradation , diets with Kikuyu grass and dairy production in Holstein cows Evaluación de suplementos alimenticios conteniendo torta de higuierilla sobre la degradación in situ de dietas c. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 12(2), 104–122. Retrieved from [dx.doi.org/10.21615/cesmvz.12.2.3](http://dx.doi.org/10.21615/cesmvz.12.2.3)
- Ramirez, I. C. (2017). *Potencial de uso de la torta de higuierilla (Ricinus communis) como suplemento alimenticio para la producción bovina*. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/59383/>
- Rocha, G. C., Palma, M. N. N., Detmann, E., & Filho, S. de C. V. (2015). Evaluation of acid digestion techniques to estimate chromium contents in cattle feces. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50(1), 92–95. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100010>
- Sampaio, C. B., Detmann, E., Valente, T. N. P., Souza, M. A., Filho, S. C. V., & Paulino, M. F. (2011). Evaluation of fecal recovering and long term bias of internal and external markers in a digestion assay with cattle 1 Recuperação fecal e vício de tempo longo de indicadores internos e externos em ensaio de digestão com bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 174–182. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000300026>
- Sandoval-Castro C., R. Quijano-Cervera, L. Ramírez-Avilés, & R. Cetina-Góngora. (2001). Determinación de cromo en heces bovinas: Variaciones en los resultados en función de la fuente de heces para la preparación de la curva de calibración. *Rev Biomed*, 12(3), 180–184. Retrieved from <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb011235.pdf>
- Souza, N. K. P., Detmann, E., Pina, D. S., Valadares Filho, S. C., Sampaio, C. B., Queiroz, A. C., & Veloso, C. M. (2013). Evaluation of chromium concentration in cattle feces using different acid digestion and spectrophotometric quantification techniques. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 65(5), 1472–

1482. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000500028>
- Sprinkle, J. E., Kress, D. D., Doornbos, D. E., Anderson, D. C., & Tess, M. W. (1995). Chromic oxide contamination ly used in marker studies of pasture previous-, 48(May), 194–197.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), 185–197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Valencia, D. M. (2015). *Efecto de la suplementación de dietas para vacas lecheras con glicerina cruda, sobre algunos parámetros de la fermentación ruminal, producción y calidad composicional de la leche*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/46450/1/43256640.2015.pdf>
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant* (2nd ed.). Comstock Publishing Associates.



## **5. Conclusiones y recomendaciones**

### **5.1 Conclusiones Generales**

El óxido de cromo es el compuesto inorgánico más ampliamente usado como marcador externo en estudios de digestibilidad y consumo de bovinos bajo condiciones de pastoreo o con suplementación, por lo que sus ventajas y desventajas han sido exploradas en cuanto a su aplicación en ensayos de campo. Aunque tiene desventajas, como su paso por el tracto digestivo independiente del movimiento de las partículas de la dieta, se ha logrado solucionar entregando al animal varias dosis al día con el propósito de evitar la variación diurna de la concentración del marcador en las heces o con la entrega de éste en dispositivos de liberación controlada. Otra de las desventajas que se le han atribuido es la toxicidad de los subproductos generados durante su análisis de laboratorio, que si bien es muy alta, depende de las vías de exposición, por lo que el riesgo en los ensayos es mínimo. Por otro lado, sus ventajas de costos, manejo, recuperación en heces y cuantificación lo hacen ideal en el momento de escoger el marcador adecuado para los ensayos de digestibilidad. En ese sentido, se hace necesario contar con un método de cuantificación apropiado que contribuya con una baja incertidumbre en los resultados de consumo.

Una de las técnicas más comunes para la cuantificación del  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en heces y alimentos, es la espectrofotométrica. Sin embargo, las imprecisiones que contiene la descripción del método más usado en el área de nutrición animal conllevan a una subestimación del marcador y por ende resultados poco fiables para la estimación del consumo, por lo que conocer los factores que influyen en los resultados en el momento de aplicar el método es crucial. A través de la evaluación de las diferentes condiciones que inciden en la

recuperación del Cr con este método, se propone un protocolo detallado con el fin de lograr la combinación de factores que optimicen su sensibilidad. Estos ensayos, basan sus resultados en análisis estadísticos rigurosos con el fin de darle mayor validez a los resultados. Cuando se utilizan este tipo de herramientas, se puede definir con un alto nivel de confianza que los parámetros de cuantificación encontrados son los más adecuados para establecer la metodología a seguir.

Por otro lado, las reacciones para el desarrollo del color con Cr y Mo han sido poco estudiadas en solución y aún no se tiene certeza de cuál es el cromóforo formado con este método, por lo que el análisis espectral brinda suficiente información para descartar, en principio, la formación de la sola especie única del ión dicromato, ya que los espectros de absorción de las soluciones resultantes con esta metodología difieren significativamente de los de referencia en el rango ultravioleta y visible. Una poderosa herramienta para el estudio de las condiciones óptimas del método y de la selección de longitudes de onda es el análisis multivariado, que en general ha sido usado para otros rangos del espectro, pero que, aplicado para la selección de variables de importancia en espectrofotometría, genera información detallada para la toma de decisiones. Con esta herramienta, se encontró que ninguna de las longitudes de onda previamente reportadas para el análisis de Cr por este método era óptima para la medición, y se logró determinar con un alto grado de confiabilidad la  $\lambda$  óptima, así como las demás condiciones del método que conllevan a establecer un protocolo ajustado para su posterior validación.

Así mismo, el proceso de validación del método ofrece evidencias objetivas de su capacidad para la reproducción de resultados confiables a través de la evaluación de parámetros como selectividad, precisión, linealidad, exactitud y estabilidad, que resultaron ser satisfactorios para el alcance propuesto y por ende el método se presenta como una alternativa confiable para la estimación de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  en estudios de digestibilidad de rumiantes, cumpliendo con el alcance propuesto. Adicionalmente, el estudio de parámetros como la selectividad, permite extender la capacidad del método a muestras que contengan dióxido de titanio, lo que brinda la oportunidad de realizar análisis de recuperación de marcadores en ensayos de dosificación simultánea, lo que facilita el trabajo de campo.



Con esto, se tiene que el método colorimétrico ofrece una opción favorable para su acuíñamiento en estudios de nutrición animal, pues no solo entrega resultados exactos y de gran precisión, sino que es de fácil implementación y de menor costo que los análisis por FASS o ICP-MS. Cuando se evalúa el método colorimétrico frente al de referencia, se encuentra que los resultados son concordantes y correlacionados, es decir que analíticamente son equivalentes. Con la implementación de este método en experimentos de campo, se establece con certeza estadística que la variación en los resultados de producción de heces no es aportada por el método, confirmando que la diferencia en los reportes de consumo está estrictamente ligado al marcador interno seleccionado.

## 5.2 Recomendaciones

Para futuros estudios, se recomienda en principio, establecer el riesgo real de exposición aérea de los analistas de laboratorio a especies volátiles de Cr (VI) que puedan ser generadas durante la preparación de las muestras con contenido de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ . Esto, debido a que hasta hoy, no existe ninguna evaluación de riesgo químico para cromo en ambientes de laboratorios bajo condiciones tropicales, y los datos de toxicidad, concentración del ión en aire, exposición del analista, ratas de flujo de aire, etc., usados por la normatividad internacional para las evaluaciones de riesgo, están muy alejados de la realidad de un laboratorio, pues éste se basa en estudios realizados en ambientes de exposición industrial donde se manipulan toneladas Cr (VI) hasta por ocho horas diarias en diferentes manufacturas y en condiciones mucho más extremas que las que se dan en un laboratorio.

Por otro lado, para la determinación de cromo en heces, se recomienda seguir la metodología propuesta de manera rigurosa con el fin de disminuir la variación de los resultados en la recuperación del analito y así obtener valores confiables de producción

de heces con mínimos márgenes de error, tal que las variaciones entre los tratamientos evaluados sean debidas únicamente a estos y no a la metodología empleada. Es necesario también, establecer el marcador interno adecuado para cada estudio, pues es el factor que más variabilidad imprime a los resultados de consumo. En este punto, la validación analítica de las metodologías mediante las cuales se obtienen los valores de los marcadores internos se hace necesaria para establecer el error de las mediciones. Dado que la recuperación del marcador interno es dependiente de la composición de la dieta ofertada al animal, es necesario, además, establecer el porcentaje de recuperación óptimo de este de acuerdo con las condiciones del ensayo, por lo que se recomienda escoger el marcador de acuerdo a un parámetro estadístico como el *RSME*.

Finalmente, con el fin de asegurar los resultados en el tiempo, se recomienda diseñar un plan de verificación que incluya la evaluación periódica de los parámetros de la validación para que haya control analítico de los resultados desde el laboratorio que permita, además, la detección de datos anómalos.